Schweizerisches Tropeninstitut, Basel

Synthese und Aufnahme von Proteinen während der Vitellogenese in Ovocyten von *Ornithodorus moubata,* Murray (Ixodoidea: Argasidae)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Leo Jenni
aus Diegten/BL

Basel 1971

Verlag für Recht und Gesellschaft A.G., Basel

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professor Dr. R. Geigy und Dr. H. Hecker.

Basel, den 9. Februar 1971.

Prof. Dr. H. P. Laubscher
Dekan

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Separatdruck aus Acta Tropica Bd. XXVIII, Heft 2, 1971

Synthese und Aufnahme von Proteinen während der Vitellogenese in Ovocyten von *Ornithodorus moubata*, Murray (Ixodoidea: Argasidae)

Inhalt

I. Einleitung 105
II. Tiermaterial 106
III. Arbeitsmethoden 107
A. Autoradiographie 107
B. Ferritinexperiment 108
C. Peroxidaseexperiment 108
D. Polysaccharidnachweis 109
IV. Resultate 109
A. Morphologie der weiblichen Geschlechtsorgane 109
1. Histologie des Ovars 110
2. Cytologie der Ovocyte 110
B. Synthese und Transport der Proteine 116
1. Autoradiographie 116
2. Ferritinversuch 130
3. Peroxidaseversuch 139
C. Polysaccharidarstellung an Ultradünnschnitten 145
V. Zusammenfassende Diskussion 152
VI. Literaturverzeichnis 155
Résumé 162
Summary 162

I. Einleitung

Mit Hilfe des Elektronenmikroskops ist es möglich, die während der Vitellogenese in der Ovocyte auftretenden Synthese- und Aufnahmevorgänge der Dottersubstanzen ultrastrukturell zu untersuchen. Unter Einbeziehung der Autoradiographie und histochemischer Nachweisreaktionen in die morphologischen Untersuchungen gelingt es, die zellphysiologisch interessanten Funktionsabläufe auf dem Niveau der Zellkompartimente zu verfolgen.

Zu den vielen Differenzierungsvorgängen während der Ontogonie der Eizellen gehören auch die morphologischen Veränderungen des Oolemmas, z. B. in Form von Microvilli oder die Bildung von Pinocytosevesikel. Die Abklärung dieser Membranspezialisierung zeigte ihren engen Zusammenhang mit der Frage nach der Herkunft der Dottersubstanzen.

Besonders intensiv wurde das Problem der Proteindotterquelle bearbeitet. Die Bereitstellung dieses Dotters erfolgt offenbar nur selten allein durch die Syntheseleistung der Ovocyte (ANDERSON & HUEBNER 1968; KESSEL 1968a).

Weit häufiger findet neben der endogenen, intraoocytären Synthese zusätzlich ein Einschleusen von exogen gebildetem Proteindotter durch Pinocytosevorgänge statt (ANDERSON 1968; BEAMS & KESSEL 1963; BEAMS & SEKHON 1966; CUMMINGS & KING 1970; COHN & BROWN 1968; DROLLER & ROTH 1966; HINSCH & CONE 1969; KESSEL 1966a, 1966b, 1968c, 1968d; KESSEL & KEMP 1962; KING, BAILEY & BABBAGE 1969; KORFSMEIER 1966; MELIUS 1966; WARTENBERG 1962, 1964).

Andere Autoren beschreiben die Aufnahme von extraoocytär gebildetem Proteindotter als dominierenden Faktor während der Vitellogenese (AGGARWAL 1968; ANDERSON 1964; BEAMS & KESSEL 1969; BIER 1963, 1968; BIER & RAMAMURTY 1964; FAVARD-SERENO 1964; HOPKINS & KING 1966; KING & AGGARWAL 1965; RAMAMURTY & MAJUMDAR 1967; ROTH & PORTER 1964; STAY 1965; TELFER 1965).

Diese meist ultrastrukturellen Arbeiten befassen sich hauptsächlich mit Insektenovocyten neben wenigen Studien an anderen Tiergruppen.

Bei den Zecken sind bis jetzt nur wenige elektronenmikroskopische Untersuchungen erschienen (*Ornithodorus moubata:* AESCHLIMANN & HECKER 1967, 1969; HECKER et al. 1968; HECKER 1970a; *Rhipicephalus bursa:* HECKER & AESCHLIMANN 1970).

Ihre Hypothese bei *O. moubata,* daß neben der endogenen auch eine exogene Dotterquelle beim Aufbau der dotterreichen Eier eine bedeutende Rolle spielt, wird durch die elektrophoretischen und immunologischen Ergebnisse von DIEHL (1969, 1970) unterstützt. Er vermutet, daß die zwei von ihm in der Hämolymphe und in den Ovocyten gefundenen «female proteins» einen Hauptanteil der Dotterproteine darstellen.

Ein erstes Ziel dieser Arbeit besteht darin, durch elektronenmikroskopisch-autoradiographische Methoden die Aufnahme und Synthese der Dotterproteine zu untersuchen. Weiter soll versucht werden, den Anteil der endogenen und exogenen Dotterquelle in bezug auf ihr zeitliches Auftreten darzustellen.

Ein zweites Ziel ist es, mit Hilfe der makromolekularen Proteintracer Ferritin und Peroxidase die Herkunft der Eihüllenproteine sowie die Aufnahme dieser in die Hämolymphe injizierten Stoffe durch die Ovocyte mittels Micropinocytose zu zeigen. Durch Darstellungsmethoden an Ultradünnschnitten soll ferner die Verteilung und der Einbau der Polysaccharide abgeklärt werden.

An dieser Stelle möchte ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. R. Geigy, für seine Anregungen, sein stetes Interesse an der vorliegenden Arbeit und für den Arbeitsplatz am Schweizerischen Tropeninstitut herzlich danken. Herrn Dr. H. Hecker spreche ich für seine vielen wertvollen Ratschläge und für die Einführung in die Elektronenmikroskopie meinen besten Dank aus. Zu großem Dank bin ich auch Herrn PD Dr. H. P. Rohr für seine Hilfe bei der Herstellung der Autoradiogramme verpflichtet. Dank gebührt auch all meinen Freunden und Kollegen, die mir im Laufe dieser Arbeit in irgendeiner Weise behilflich waren.

II. Tiermaterial

Die für die Untersuchungen verwendeten Zecken, *Ornithodorus moubata,* stammen aus dem Ulanga District (Tanzania). Sie werden seit einigen Jahren nach der von GEIGY & HERBIG (1955) beschriebenen Methode am Tropeninstitut gezüchtet und von Zeit zu Zeit durch Frischimporte ergänzt. Die Blutmahlzeiten erfolgen auf Meerschweinchen. Die Haltung der Zecken im Zuchtraum geschieht bei 25 bis 26° C und bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70–80%.

III. Arbeitsmethoden

A. Autoradiographie

Der Proteinvorläufer 3H-L-Leucin kam als Tracer zur Anwendung. Den 0,25 g schweren Zeckenweibchen wurden 10 Tage nach Blutmahlzeit und Begattung (gilt für Experiment A, B, C und D) je 5 μC 3H-L-Leucin (Radiochemical Centre Amersham, England) in physiologischer NaCl-Lösung durch eine Coxa in die Haemolymphe des Haemocoels injiziert. Die Sektion der Ovarien von je 5 Zecken erfolgte 1, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 Min. und 6 Std. nach der Injektion direkt im Vorfixierungsmittel.

Dabei wurde jeweils kurz vor der Sektion durch Abschneiden einer Extremität auf der Höhe der Coxa der «heiße» Hämolymphtropfen (= Hämolymphe + radioaktiver Tracer) zurückgewonnen und sofort in die Hämolymphe von Zecken einer zweiten Versuchsserie injiziert. Dieser sekundäre Versuch diente neben der Beobachtung der Darmepithelmarkierung (siehe 1a) dazu, den Zeitpunkt zu ermitteln, bei welchem der Tracer nicht mehr als Aminosäure, sondern als bereits synthetisiertes Protein zur Verfügung stand. Die Tiere der zweiten Serie wurden nach 1, 5, 10, 30, 60, 120 und 240 Min. seziert.

Anschließend wurden die gewonnenen Organe nach den folgenden Vorschriften (s. 1b und folgende Kapitel) weiter präpariert:

1. Lichtmikroskopische Autoradiographie

a. Präparation ganzer Zecken

Um die Aufnahme und Verteilung der injizierten Isotopensubstanz im ganzen Zeckenkörper zu kontrollieren, wurden je 2 ganze Zecken 15, 30, 60, 90 und 120 Min. nach der Injektion während 6 Std. in Bouin Duboscq fixiert. Dabei entfernte man die 8 Extremitäten und das Rostrum, um das Eindringen der Präparationslösungen zu erleichtern. Die anschließende Entwässerung erfolgte über eine Alkohol-Aceton-Propylenoxidreihe, die Einbettung in Epon.

Die Polymerisation dauerte 72 Std. bei 60° C. 6 μ dicke Schnitte wurden auf dem Knochenmikrotom 1120 (Jung) hergestellt und auf Glasobjektträger bei 60° C aufgeklebt.

b. Präparation der Ovocyten

Die freipräparierten Ovarien mit den Ovocyten in allen Reifestadien wurden mit 3% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (CP), pH 7,3, während 3 Std. bei 4° C vorfixiert. Das Auswaschen des Vorfixierungsmittels erfolgte in 0,1 M CP + 5% Saccharose während 8 Std. bei 4° C. Nachfixation mit 2% OsO_4 in 0,2 M CP, pH 7,3, während 2 Std. bei 4° C. Entwässerung über die aufsteigende Acetonreihe + Propylenoxid. Eingebettet wurde in Epon.

Um mit Hilfe eines lichtmikroskopischen Vorversuches den Aktivitätsgrad des Isotops zu eruieren, wurden vorerst mit Glasmessern auf dem Reichert OmU_2 Schnitte von 2 μ Dicke hergestellt und auf Objektträger gebracht.

Autoradiographische Verarbeitung der unter a und b gewonnenen Präparate durch Aufbringen der Emulsionschicht mittels der Eintauchmethode (Markus 1965).

Es kamen die Ilford-Emulsionen G5 und K5 zur Anwendung (mit Aqua bidest.

1 : 1 verd.). Die Expositionszeit im Tiefkühlschrank betrug 10 bis 20 Tage. Entwicklung der Autoradiogramme mit Agfa Metinol U, Fixierung mit gesättigter Natriumthiosulfatlösung. Anschließende Schnittfärbung mit Azur-II-Methylenblau.

2. Elektronenmikroskopische Autoradiographie

Ultradünnschnitte (Reichert OmU_2) der Ovocytenpräparate wurden auf collodiumbefilmte Kupfernetze gebracht; und mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert. Eine aufgedampfte Kohlenschicht von ca. 50 Å Dicke verhinderte eine Reoxidation von Gewebsteilen. Bei unseren Versuchen kamen die Ilford-Emulsionen L4 und K2 zur Anwendung, wobei vor allem L4 wegen der kleineren Silberbromidkristallgröße ausgewertet wurde.

Aufbereitung der Emulsionen nach Caro & Van Tubergen (1962).

Eine geringe Emulsionsmenge wurde mit einer Mikropipette aufgezogen, mit dem Mund eine Blase gebildet und diese über den Schnitten zum Platzen gebracht (Caro 1961; Rohr et al. 1965, 1967).

Zur Beurteilung des Emulsionsfilmes wurden Leerkontrollen hergestellt. Der Nulleffekt war unerheblich und konnte vernachlässigt werden. Expositionszeit: 12 Wochen bei Dunkelheit im Tiefkühlschrank (Salpeter & Bachmann 1964).

Entwicklung mit Kodak Mikrodol X für L4 und Agfa Metinol U für K2; Fixierung mit gesättigter Natriumthiosulfatlösung.

Zum Teil wurde von den noch feuchten Präparaten durch kurzes Flottieren auf 0,5 N Essigsäure bei 37° C die Gelatineschicht entfernt (Caro 1962; Moses 1964).

70% der hergestellten Autoradiogramme waren von guter Qualität und konnten für die Auswertung verwendet werden.

Pro Versuchszeit wurden die Silberkornfilamente auf je 20 Schnitten ausgezählt (Tab. 1 und 2). Eine semiquantitative Auswertung, d. h. die Kombination von Silberkornauszählung und Morphometrie, konnte nicht durchgeführt werden, da die Morphometrie der Zellkompartimente wegen deren starken Dynamik im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war.

B. Ferritinexperiment

Ferritin, ein Protein mit einem mittleren Moleküldurchmesser von 94 Å, enthält bis zu 40% Eisenhydroxid in Form eines etwa 55 Å großen elektronendichten Kerns (Farrant 1954).

Das Ferritin (aus Pferdemilz, Fluka) wurde als 50%-Lösung durch Cellophan gegen Aqua bidest. dialysiert, um die toxischen Bestandteile möglichst zu eliminieren, und nachher lyophilisiert.

15% Ferritin, gelöst in NaCl physiol., injizierte man in das Hämocoel der Zeckenweibchen. Die Tiere wurden 1, 5, 10, 30, 60, 120, 240 Min. und 6 Std. nachher im Vorfixierungsmittel seziert. Daneben erfolgte ein Versuch an Ovarien *in vitro* mit den Inkubationszeiten: 1, 5 und 10 Min.

Weiterbehandlung: siehe unter A 1b.

C. Peroxidaseexperiment

Peroxidasen katalysieren die Oxidation eines Substrates durch Wasserstoffsuperoxid nach folgendem vereinfachten Schema:

$$\text{Peroxidase} + H_2O_2 \rightarrow \text{Peroxidase} \cdot O + H_2O$$
$$\text{Peroxidase} \cdot O + \text{Substrat} \cdot H_2 \rightarrow$$
$$\text{Peroxidase} + \text{oxid. Substrat} + H_2O$$

(vgl. GEYER 1969).

Als Substrat wurde das Karnovsky-Medium 3'3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DABTH) verwendet (FRIEND 1967; GRAHAM 1966; KARNOVSKY 1965, 1967; LOCKE 1968; STRAUS 1964).

Präparation: Zeckenmaterial und Inkubationszeiten der Peroxidase *in vivo* und *in vitro* wie unter A und B.

Injektion in das Hämocoel von 1 mg Meerrettichperoxidase (Boehringer Typ 2) pro Zecke, gelöst in NaCl physiol. Vorfixierung der Ovarien und Ovocyten mit 3% Glutaraldehyd in 0,1 M CP, pH 7,3, 3 Std. bei 4° C. Auswaschen in 0,1 M CP + 5% Saccharose, ca. 8 Std. bei 4° C.

Die Organe wurden anschließend während 30 Min. inkubiert. Inkubationsgemisch: 10 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer; 3,5 g DABTH (Sigma); 0,4 ml Perhydrol Merck 30%/1 : 100 mit H_2O verdünnt, pH 7,5–7,6, bei Raumtemperatur.

Zur Kontrolle wurden Ovarien und Ovocyten ohne vorherige Peroxidasebehandlung ebenfalls inkubiert, um eine eventuelle Pseudoperoxidase nachzuweisen.

Nachher kurzes viermaliges Auswaschen: 1. 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,5–7,6); 2. NaCl physiol.; 3. + 4. 0,05 M Tris-HCl-Puffer.

Nachfixieren und weitere Präparationsschritte wie unter A und B.

Die Schnitte der Experimente B und C wurden nicht nachkontrastiert. Die Aufnahme erfolgte auf den Elektronenmikroskopen Zeiss EM 9 und Philips EM 300.

D. Polysaccharidnachweis

Die Präparation der Ovarien mit den Ovocyten erfolgte 10 Tage nach Blutmahlzeit und Begattung wie unter A 1b. Das Vorhandensein von Glykogen und anderen Polysacchariden in den Ovocyten wurde mit cytochemischen Methoden (THIERY 1967; 1969; LONGO & ANDERSON 1970) an Ultradünnschnitten durch Flottieren auf den verschiedenen Lösungen nachgewiesen.

1. Kontrolle: 0,1 M Cacodylatpuffer, 12 Std., 37° C.
2. α-Amylasebehandlung: 0,1% α-Amylase, 12 Std., 37°.
3. Oxydation der Polysaccharide (LONGO & ANDERSON 1970): 3,2% Periodicacid (PA)- 1Std., 23° C. Nachkontrastieren mit Uranylacetat und Bleicitrat.
4. PA-TCH-Albumosesilber-Methode (THIERY 1967, modifiziert): a) 1% PA, 35 Min., 23° C. b) Mehrfaches Waschen, Aqua bidest., 1 Std., 23° C. c) 0,2% Thiocarbohydrazid (TCH) in 20% Essigsäure, 0,5, 1, 24, 48, 72 Std., 23° C. d) Waschen: 10% Essigsäure, 15 Min., 23° C; 5% Essigsäure, 15 Min., 23° C; 3 × Aqua bidest., 15 Min., 23° C. e) 1% Albumosesilber in Aqua bidest., 30 Min., 23° C. f) Waschen: Aqua bidest., 20 Min., 23° C.
5. Um die Spezifität der Methode 4. nachzuprüfen, wurden die von THIERY (1967, 1969) angegebenen Kontrollen angewendet.

IV. Resultate

A. Morphologie der weiblichen Geschlechtsorgane

In den lichtmikroskopischen Arbeiten von AESCHLIMANN (1958), BALASHOV (1964), BURGDORFER (1951), DIEHL (1969, 1970), LEES &

BEAMENT (1948) und WAGNER-JEVSEENKO (1958) wird die Morphologie der weiblichen Geschlechtsorgane von *Ornithodorus moubata* eingehend untersucht und beschrieben.

AESCHLIMANN & HECKER (1967, 1969), HECKER & AESCHLIMANN (1970) und HECKER (1970a/b) befaßten sich mit der Ultrastruktur des Ovars und der reifenden Ovocyten.

Die Resultate aller dieser Autoren sollen an dieser Stelle zusammengefaßt und zum Teil durch eigene Ergebnisse ergänzt werden.

1. Histologie des Ovars

Das im hinteren Körperabschnitt liegende Ovar (Hohlorgan) zeigt eine gebogene Form und ist an beiden Enden mit den proximalen Tubuli der Ovidukte verbunden. Die Ovarwand besteht aus einem ein- bis mehrschichtigen Ovarepithel, zusammengesetzt aus Epithelzellen, Oogonien und Ovocyten I.

Das Ovar umgeben vereinzelte quergestreifte Muskelzellen. Zwischen die Epithelzellen führen feine Tracheen. Das ganze Organ ist von einer dünnen Basallamina umschlossen und gegen das Hämocoel hin abgegrenzt.

Die sich während der Oogenese entwickelnden Ovocyten I treten aus der Ovarwand aus (extraovarielle Lage) und ragen ins Hämocoel bzw. in die Hämolymphe hinein (Abb. 1). Sie sind dabei durch einen zellulären Funiculus, welcher aus einem einschichtigen Band von Epithelzellen besteht, mit dem Ovar verbunden. Die Begrenzung der Ovocyten gegen das Hämocoel wird einzig durch die auch dem Oolemma aufliegende Basallamina (Tunica propria = «manteau») gebildet (Abb. 2).

Follikelzellen wie bei anderen Arthropodengruppen, z. B. bei Krebsen (KESSEL 1968a) und bei Insekten (WEBER 1966), fehlen.

2. Cytologie der Ovocyte

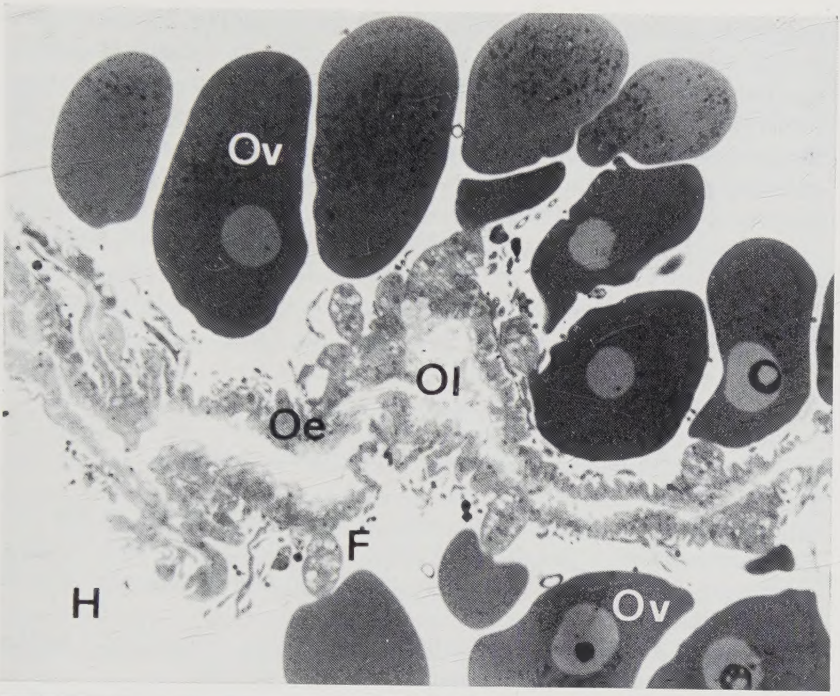
Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden an Ovocyten durchgeführt, die sich in der Oogenesephase der Vitellogenese befanden. Anschließend an die Prävitellogenese, die durch eine starke Volumenzu-

---

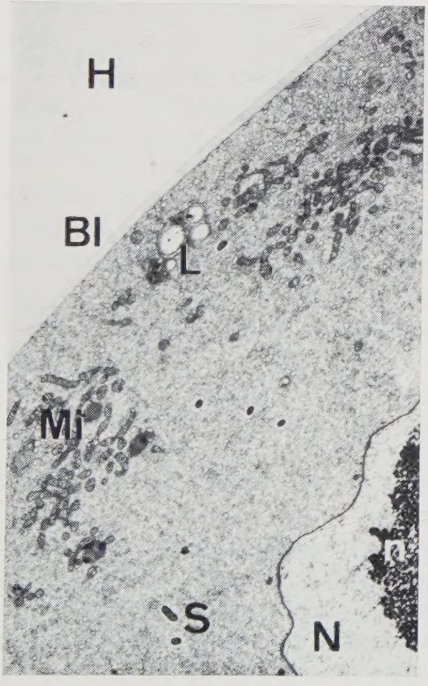
Abb. 1. Übersicht eines Ovarabschnittes mit den Ovocyten im Stadium A und B. F = Funiculus, Ov = Ovocyte, Oe = Ovarepithel, Ol = Ovarlumen, H = Hämocoel; (Semidünnschnitt); Vergr. 250fach.

Abb. 2. Ovocyte im Stadium A. Begrenzung der Ovocyte (O) gegen das Hämocoel (H) durch die Basallamina (Bl). N = Nucleus, n = Nucleolus, Mi = Mitochondrien, S = Symbionten, L = Lysosom; Vergr. 3500fach.

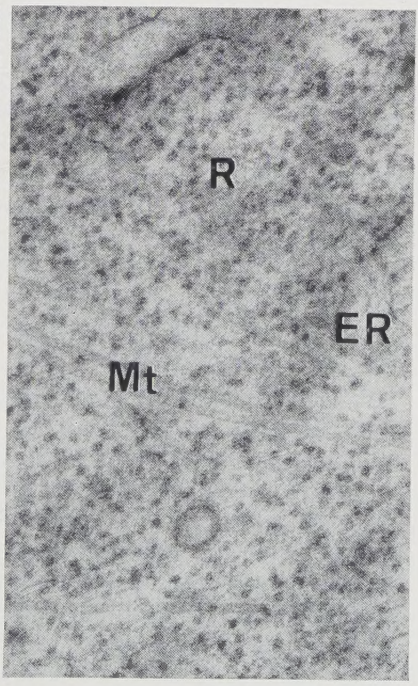
Abb. 3. Cytoplasma im Stadium A mit Microtubuli (Mt), Ribosomen (R) und teilweise agranulärem Ergastoplasma (ER); Vergr. 54 000fach.



1



2



3

nahme des Cytoplasmas, des Kerns und des Nucleolus gekennzeichnet ist (DIEHL 1970), beginnt die Vitellogenese. Sie wird durch eine Blutmahlzeit und nachfolgende Begattung ausgelöst. Nach AESCHLIMANN (1968) scheinen für eine normal ablaufende Vitellogenese nicht nur die Blutmahlzeit, sondern noch zusätzliche, während der Kopulation eingeführte männliche Substanzen, welche das endokrine System des Weibchens aktivieren, notwendig zu sein.

Dabei ist der noch ungeklärte Umstand zu erwähnen, daß nicht alle Ovocyten zur selben Zeit mit der Vitellogenese beginnen, so daß man 10 Tage nach der Blutmahlzeit Ovocyten in sämtlichen Vitellogenesestadien findet.

a. Aufbau des Syntheseapparates (Stadium A)

Während den ersten 48 Std. der Vitellogenese zeigt die Ovocyte folgendes ultrastrukturelles Bild:

Im Cytoplasma liegen sehr viele freie Ribosomen (Abb. 3). Das Ergastoplasma ist anfänglich vakuolär und bildet dann auch längere verzweigte Stücke, deren Membranen wenig mit Ribosomen besetzt sind (HECKER 1970a).

Die Zahl der zu Beginn spärlich vorhandenen Golgi-Zonen nimmt zu, und es kommt zur Ausbildung von Golgi-Vesikeln.

Vereinzelt findet man «Annulate lamellae» (Abb. 69, und AESCHLIMANN & HECKER 1970; KESSEL 1968), deren Funktion bis heute nicht ganz abgeklärt ist. KING & RICHARDS (1968) beschreiben sie im Zusammenhang mit der Lipoidbildung in Hymenopteren-Ovocyten, während BABBAGE & KING (1970) ihnen einen wichtige Rolle bei der Vermehrung von Mitochondrien während der Zellteilung zuschreiben.

Das Cytoplasma ist ähnlich wie in Eiern von *Limnea palustris* (MORILL et al. 1967) und *Rhipicephalus bursa* (HECKER & AESCHLIMANN 1970) vor allem an der Peripherie von Microtubuli durchsetzt (Abb. 3).

Sie können eine cytoskelettale Funktion haben (FAWCETT 1966). Andere Autoren (KESSEL 1967; MACGREGOR & STEBBINGS 1970; MCINTOSH & PORTER 1967; PORTER 1966, ROBINSON 1966, TILNEY & PORTER 1965, 1967) beschreiben sie als unterstützende Elemente der cytoplasmatischen Bewegung.

Ebenfalls eher peripher als zentral liegen Gruppen von Mitochondrien (Abb. 2).

Längliche und runde Formen von rickettsienähnlichen Microorganismen (BUCHNER 1965; HECKER et al. 1968; HECKER 1970b) sind zu Beginn der Vitellogenese im ganzen Cytoplasma in Gruppen verteilt. Sie vermehren sich intensiv und sammeln sich an der dem Funiculus diametral gegenüberliegenden Ovocytenperipherie (DIEHL 1970).

Der Eikern behält seinen während der Prävitellogenese erlangten euchromatischen Zustand bei. Seine exzentrische Lage in Funiculusnähe polarisiert die Ovocyte. Ultrastrukturell können im Karyoplasma keine Chromosomen gefunden werden (AESCHLIMANN & HECKER 1967, 1969; HECKER 1970a). Auch mit histochemischen Methoden (DIEHL 1970) konnte die im Kern enthaltene DNS nicht nachgewiesen werden. Dieser negative DNS-Befund ist auch bei verschiedenen anderen Ovocytenkernen bekannt (ARNDT 1960; BIER 1968; RAVEN 1961; STERBA & SCHAEFFNER 1965).

Der Nucleolus ist intensiv «vakuolisiert». Er besteht aus fein granulären und filamentösen Elementen. Sein runder vakuolärer Cortex umschließt oft eine große zentrale «Vakuole» (HECKER 1970a).

Nach den histochemischen Untersuchungen von DIEHL (1970) bestehen die im Karyoplasma neben dem Nucleolus vorhandenen Nebenkörper («corps secondaires» nach AESCHLIMANN & HECKER 1967), deren Auftreten am Ende dieser Phase beginnt, aus Ansammlungen von Ribonucleoproteinen. Ultrastrukturell erscheinen sie als Granulaanhäufungen (Granula von Ribosomengröße).

Die während der Prävitellogenese gebildeten Einstülpungen der Zellmembran ins Cytoplasma (AESCHLIMANN & HECKER 1967) werden durch Abtrennung einzelner Vesikel aufgelöst (Abb. 4). An ihrer Stelle kommt es an der ganzen Ovocytenoberfläche zur Ausbildung von Microvilli (Abb. 5). Während der ersten Phase der Vitellogenese wird somit der ganze Syntheseapparat der Ovocyte aufgebaut, welcher während der nun folgenden Hauptphase mithilft, die Dottersubstanzen weiter aufzubauen. Einzelne Vorstufen des Proteindotters treten bereits im gesamten Cytoplasma während des Stadiums A auf.

b. Synthese des Dotters und Bildung der Eihülle (Stadium B)

AESCHLIMANN & HECKER (1967, 1969) untersuchten ultrastrukturell die Synthesevorgänge in der Ovocyte während der Vitellogenese. Die histochemische Zusammensetzung der verschiedenen Syntheseprodukte und der Hämolymphe werden in den Arbeiten von DIEHL (1969, 1970) beschrieben.

Proteine, welche an den freien Ribosomen gebildet werden, können über das ER in die nun zahlreich vorhandenen Golgi-Felder gelangen. Sie werden verdichtet und treten in kleinen membrangebundenen Bläschen wieder ins Cytoplasma aus, wo sie sich zu proteinhaltigen Dottervorstufen («multivesiculate bodies») vereinigen. Die anfänglich noch klar sichtbaren Membranen der einzelnen Bläschen verschwinden zusehends (AESCHLIMANN & HECKER 1969), und es entstehen homogene proteinhaltige (Hämo-glyko-lipoproteine nach DIEHL 1970) Dotterkugeln (Abb. 6). Diese liegen vorerst im peripheren Bereich des Cytoplasmas, später sind sie gleichmäßig verteilt. Durch Anlagerung weite-

rer Bläschen bzw. Vesikel wachsen die Dotterkugeln rasch und erreichen einen mittleren Durchmesser von 70 μ.

An der Basis der bis zu 4 μ langen Microvilli bilden sich Pinocytosebläschen («coated vesicles»), welche ins periphere Cytoplasma einwandern. Diese Vesikel vereinigen sich mit bereits vorhandenen und endogen aufgebauten Dotterkugeln (Abb. 7).

Zwischen den Dotterkugeln erscheinen trigliceridhaltige Lipidvakuolen (DIEHL 1970) und rosettenförmiges Glykogen (AESCHLIMANN & HECKER 1969).

Ungefähr gleichzeitig mit dem Aufbau des Dotters wird die proteinhaltige Eihülle gebildet, wobei einzelne Eihüllensegmente bereits gegen das Ende des Stadiums A auftreten können. Frühere Autoren (AESCHLIMANN 1958; AESCHLIMANN & HECKER 1967, 1969; DIEHL 1970; HECKER & AESCHLIMANN 1970; LEES & BEAMENT 1948 und WAGNER-JEVSEENKO 1958) nahmen an, daß sie von der Ovocyte selbst durch Exocytose gebildet werde, und nannten sie deshalb im Gegensatz zum exogenen Insektenchorion, Eihülle.

Wie bereits vermerkt, beginnt die Einlagerung der Eihüllensubstanzen in Form von einzelnen Schollen zwischen den Microvilli (Abb. 7). Durch den Einbau weiterer Substanz vereinigen sich die Schollen, bis eine homogene Eihülle von ca. 4 μ Dicke entsteht. Die meisten Microvilli werden dabei verdrängt und abgebaut. Einzelne bleiben aber bis vor der Ovulation bestehen. Der Kern schrumpft kurz vor Beendigung der Vitellogenese zusammen. Die Kernmembranen lösen sich auf, und das Kernmaterial liegt zwischen den Dotterkugeln in der Nähe des Funiculus (DIEHL 1970). Ebenso verschwinden die übrigen Zellorganellen fast vollständig.

Die Symbionten, vor allem die runden Formen, stehen oft in Verbindung mit lysosomalen Abbaustrukturen (HECKER et al. 1968). Daß es sich dabei um Lysosomen (DE DUVE 1963) handelt, bewies ihre positive Reaktion auf saure Phosphatase (HECKER, persönliche Mitteilung).

Nach einer Präovipositionszeit von 9–15 Tagen haben die leicht ovalen, reifen Eier einen mittleren Durchmesser von 1000 μ erreicht. Die Vitellogenese ist abgeschlossen und die Eier sind ovulationsbereit. Der

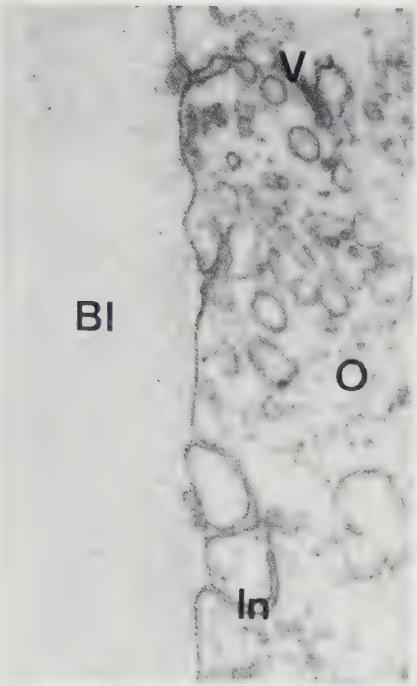
---

Abb. 4. Oolemmainvaginationen (In) zu Beginn des Stadiums A in vesikulärer Auflösung (V). Bl = Basallamina, O = Ovocyte; Vergr. 61 500fach.

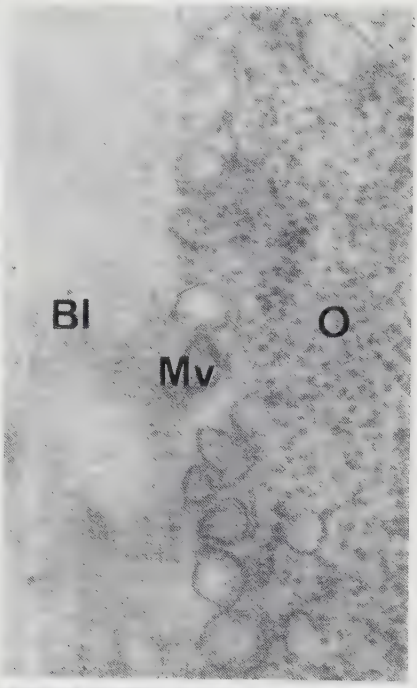
Abb. 5. Aufbau der Microvilli (Mv) während des Stadiums A. Bl = Basallamina, O = Ovocyte; Vergr. 61 500fach.

Abb. 6. Bildungsphase des Proteindotters im Stadium B. Aus den Golgi-Feldern (G) austretende Vesikel (V) gelangen zu den Dottervorstufen (Dv). S = Symbiont; Vergr. 15 000fach.

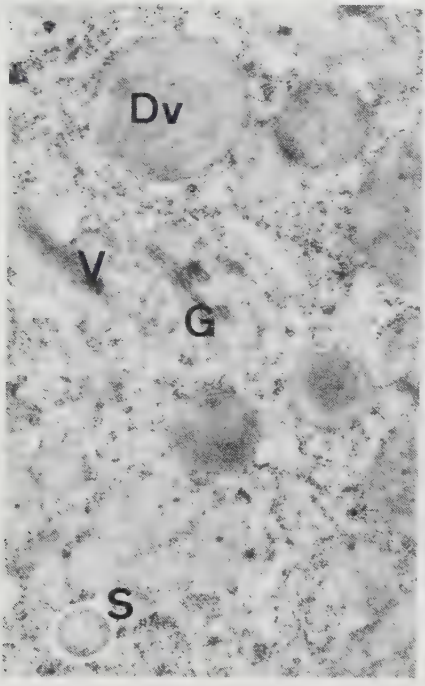
Abb. 7. Pinocytosevorgang im Stadium B. An der Basis der Microvilli (Mv) auftretende «coated vesicles» (cv) vereinigen sich mit Dottervorstufen (Dv). Do = Dotterscholle, Eh = Eihülle im Aufbau; Vergr. 12 000fach.



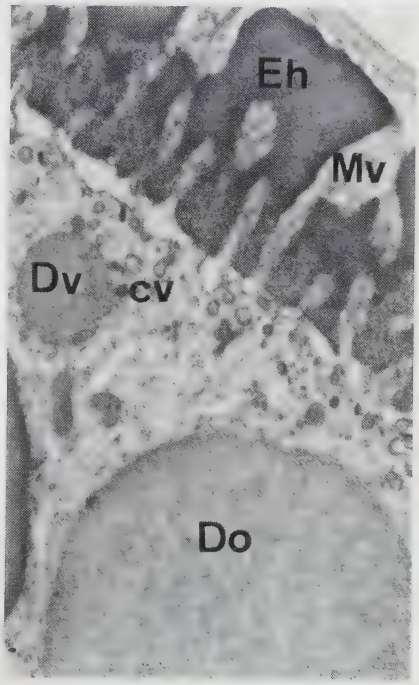
4



5



6



7

Ovulationsprozeß, d. h. das Einwandern der Eizelle zwischen den Funiculus- und Ovarwandzellen hindurch ins Ovarlumen konnte nie beobachtet werden. Dieser Vorgang spielt sich wahrscheinlich sehr rasch ab.

Durch die beiden Ovidukte gelangen die Eier in den Uterus, wobei sie infolge Wasseraufnahme eine Volumenvergrößerung von 60–89% erfahren. Die Eihülle verliert dabei durch noch ungeklärte Härteprozesse ihrer Proteinstrukturen an Elastizität (Diehl 1970).

B. Synthese und Transport der Proteine

Die Synthese und Einbauvorgänge von Proteinen in den Ovocyten wurden mit Hilfe von drei verschiedenen Methoden ultrastrukturell untersucht:

1. Autoradiographie
2. Ferritinversuch
3. Peroxidaseversuch

1. Autoradiographie

Der in die Hämolymphe injizierte Aminosäuretracer 3H-Leucin konnte direkt in die in allen Stadien heranreifenden Ovocyten eindringen, da die Eizellen, wie schon oben erwähnt, lediglich durch die Basallamina gegen das Hämocoel abgegrenzt werden. Das zeigte sich bei der Auswertung der Autoradiogramme darin, daß, bedingt durch den kurzen Weg, bereits nach 1 Min. einzelne Silberkornfilamente über den freien Ribosomen des Eicytoplasmas liegen. Die markierte Aminosäure ist demzufolge schon nach kurzer Zeit in einen höher molekularen Stoff eingebaut, da mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Fixation und Dehydration des Gewebes alle wasserlöslichen und niedermolekularen Stoffe aus der Ovocyte herausgelöst wurden (Bier 1963; Peters & Ashley 1967; Rohr et al. 1967; Schmalbeck & Rohr 1967).

Um die Verfügungszeit der freien Aminosäure zu ermitteln, wurden in den lichtmikroskopischen Autoradiogrammen ganzer Zecken die Einbauraten des Leucins im Darmepithel bestimmt. Dieses Gewebe scheint bei *O. moubata* einen hohen Proteinmetabolismus aufzuweisen. Die Zellen des Darmepithels zeigten nach 1 Std. ein Markierungsmaximum. Daraus kann geschlossen werden, daß nach dieser Zeit in der Hämolymphe kein wesentliches Angebot an freiem 3H-Leucin mehr vorhanden ist. Nach weiteren 30 Min. hat die Aktivität im Darmepithel bereits wieder um 30% abgenommen.

a. Einbaumuster zu Beginn der Vitellogenese (Tabelle 1)

(Stadium A: die ausgewerteten Ovocyten zeigen noch keine Pinocytosevorgänge und der Microvillisaum ist erst im Aufbau begriffen. Alle Ovocyten haben ungefähr dieselbe Größe).

Die Gesamtaktivität über den Ovocyten ist nach 5 Min. relativ gering. Rund die Hälfte der Silberkörner liegt über den freien Ribosomen. Das Ergastoplasma und die Golgi-Felder sind im Vergleich zu den Ribosomen noch schwach markiert. Die Leucinaktivität des Kerns ist verhältnismäßig hoch und verteilt sich gleichmäßig auf Karyoplasma und Nucleolus.

Nach 15 Min. ist eine deutliche Zunahme der Gesamtaktivität zu erkennen. Der prozentuale Anteil der Silberkörner über den Ribosomen hat im Vergleich zu oben leicht abgenommen, während die absolute Zahl der Körner gestiegen ist (Abb. 8). Das ER und die Golgi-Felder sind stärker markiert. In den Golgi-Zonen liegt die Markierung anfänglich über den Vakuolen und später über den Vesikeln, aber praktisch nie über den Golgi-Lamellen. Zur selben Zeit sind bereits markierte Eiweißverbindungen in den Dottervorstufen (Proteindotter) zu erkennen (Abb. 9). Die prozentuale Silberkornverteilung über dem Kern ist gleichgeblieben.

Nach 30 Min. ist nochmals eine deutliche Erhöhung der Gesamtaktivität zu beobachten. Immer noch liegt rund die Hälfte der Körner über den freien Ribosomen. Daneben hat die Radioaktivität des ER und der Golgi-Felder deutlich zugenommen. Die eiweißhaltigen Dottervorstufen sind vermehrt markiert. Im Kern verschiebt sich die Einbaurate auf die Seite des Nucleolus (Abb. 10).

Tabelle 1. Absolute (a) und prozentuale (b) Silberkornverteilung zu Beginn der Vitellogenese (Stadium A)

	5 Min.		15 Min.		30 Min.		60 Min.		120 Min.		240 Min.	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Freie Ribosomen	263	57,5	312	45,5	458	46,5	320	30	212	20	186	17
Ergastoplasma	58	12,5	120	17,5	208	21	336	31	246	23	198	18
Golgi-Feld	21	4,5	76	11	95	9,5	127	11,5	196	18	248	22,5
Proteinhaltige Dottervorstufen	8	2	14	2	48	5	102	9,5	198	18,5	276	25
Kern:												
Karyoplasma	47	10	68	10	50	5,5	46	4	41	4	32	3
Nucleolus	45	10	77	11	98	10	126	11,5	151	14	136	12,5
Mitochondrien	16	3,5	21	3	24	2,5	30	2,5	26	2,5	25	2
Gesamtaktivität	458		688		981		1087		1070		1101	

60 Min. nach der Injektion hat die Gesamtaktivität ein Maximum erreicht. Die Zahl der Silberkörner über den Ribosomen hat sichtlich abgenommen, während sie über dem ER nochmals angestiegen ist. Golgi-Felder und Dottervorstufen sind im Vergleich zur obigen Versuchszeit ebenfalls stärker markiert. Der Nucleolus weist eine nochmals erhöhte Einbaurate des Tracers auf, daneben ist die Zahl der Silberkörner über dem Karyoplasma gleichgeblieben.

Da die Gesamtaktivität bei 60, 120 und 240 Min. gleichbleibt, lassen sich die absoluten und prozentualen Silberkornanteile der drei Versuchszeiten direkt vergleichen:

Die Einbauraten des 3H-Leucins in die Ribosomen und im ER nehmen stetig ab und fallen bei den Ribosomen unter den Anfangswert bei 5 Min. Dagegen steigt die Anzahl der Silberkörner über den Golgi-Feldern und den Dottervorstufen sichtbar an. Die Markierung des Nucleolus nimmt, nachdem sie bei 120 Min. nochmals zunahm, nach 240 Min. wieder leicht ab (Abb. 11).

Die Auswertung der Autoradiogramme nach 6 Std. ergab folgende Resultate: Die Gesamtaktivität ist gleichgeblieben. Die Zahl der Silberkörner über den freien Ribosomen und dem ER hat merklich abgenommen und liegt bei beiden um 8%. Die Golgi-Zonen zeigen ebenfalls eine Verminderung der Aktivität. Ihr prozentualer Anteil beträgt noch 10%. Die Markierung der primären proteinhaltigen Dotterschollen, die im gesamten Bereich des Cytoplasmas gebildet werden, ist nun stark angestigen. Im Kern, insbesondere im Nucleolus, ist die Einbaurate des Tracers auf die Hälfte reduziert worden.

b. Einbaumuster während der Hauptphase der Dottersynthese und der Eihüllenbildung (Tabelle 2).

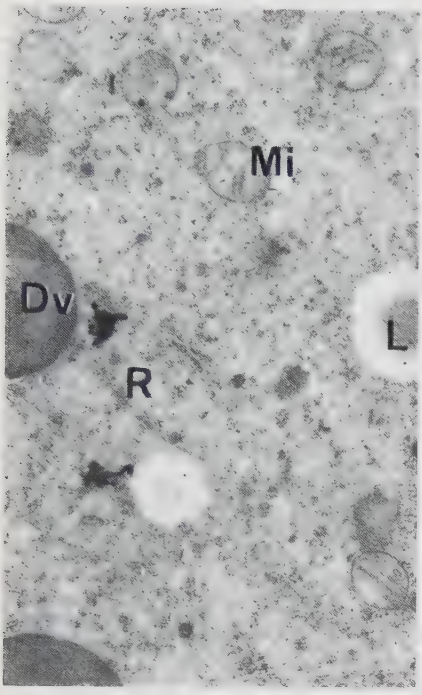
(Stadium B: die ausgewerteten Ovocyten zeigen einen prägnanten Microvillisaum mit einzelnen Eihüllenschollen und deutliche Pinocytosevorgänge).

Abb. 8. Ovocyte im Stadium A: 15 min nach der 3H-Leucin-Injektion. Die Aktivität befindet sich über den Ribosomen (R). Dv = Dottervorstufen, Mi = Mitochondrien, L = Lipidtropfen; Vergr. 15 000fach.

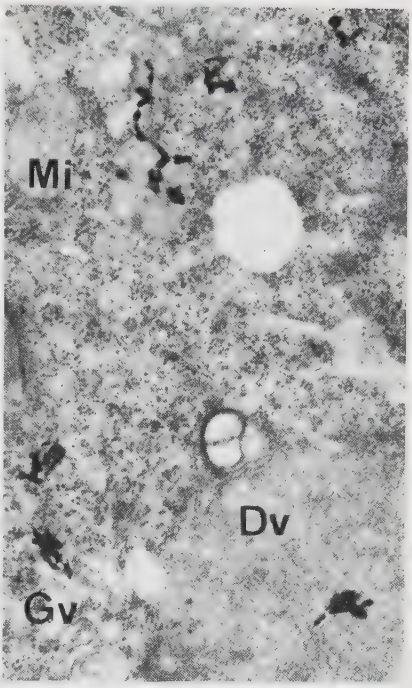
Abb. 9. Stadium A: 15 min nach der Leucin-Injektion liegen einzelne Silberkornfilamente über den Dottervorstufen (Dv) und den Golgi-Vakuolen (Gv), Mi = Mitochondrien; Vergr. 24 000fach.

Abb. 10. Stadium A: 30 min nach der Injektion von 3H-Leucin. Die Verschiebung → der Aktivität aus den Golgi-Feldern (G) in die Proteindottervorstufen (Dv) kann nachgewiesen werden. Gve = Golgi-Vesikel, Mi = Mitochondrien; Vergr. 18 000fach.

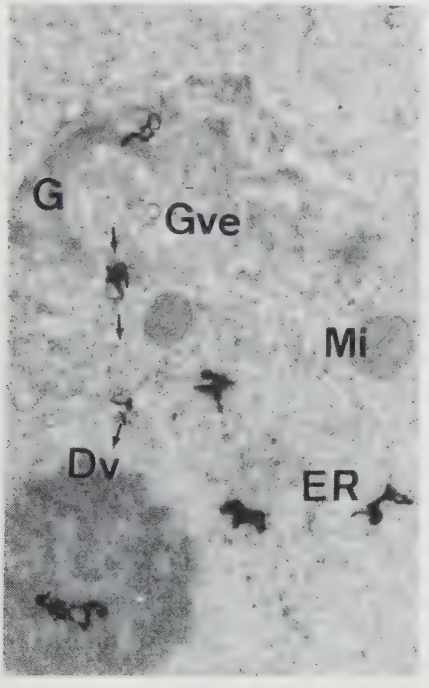
Abb. 11. Stadium A: 120 min nach der Leucin-Injektion. Der Hauptanteil der Markierung liegt über den Dottervorstufen (Dv) und den Golgi-Vesikeln (Gve). G = Golgi-Feld; Vergr. 15 000fach.



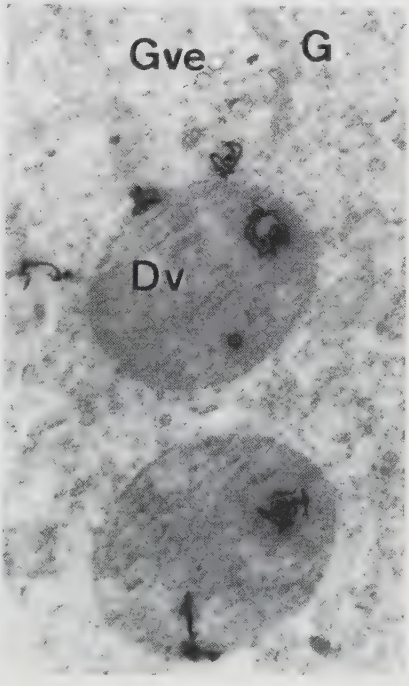
8



9



10



11

Tabelle 2. Absolute (a) und prozentuale (b) Silberkornverteilung während der Dottersynthese und dem Eihüllenaufbau (Stadium B)

	5 Min.		15 Min.		30 Min.		60 Min.		120 Min.		240 Min.	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Ovocytenzentrum:												
Freie Ribosomen	304	52,5	346	35,5	390	27,5	270	15	173	8,5	74	3,5
Ergastoplasma	88	15	158	16	193	13,5	240	13	135	7	52	2,5
Golgi-Feld	36	6	89	9	121	8,5	158	8,5	143	7	83	4,5
Proteindotter:												
Dottervorstufen	12	2	48	5	152	11	198	11	260	13	302	15
Homogener Dotter	10	2	37	4	136	9,5	146	8	305	15	452	22,5
Kern:												
Karyoplasma	26	4,5	21	2	7	0,5	18	1	31	1,5	22	1
Nucleolus	38	6	69	7	77	5,5	58	3	29	1,5	26	1
Corps secondaires	5	1	26	2,5	48	3,5	89	5	53	2,5	42	2
Mitochondrien	22	4	18	2	22	1,5	31	1,5	26	1,5	21	1
Ovocytenperipherie:												
Freies Cytoplasma	11	2	78	8,5	96	6,5	128	7	168	8,5	92	4,5
Proteindotter:												
Dottervorstufen	8	1,5	29	3	50	3,5	138	7,5	152	7,5	146	7
Homogener Dotter	7	1	16	1,5	59	4	118	6,5	162	8	266	12,5
Eihüllenvorstufen	5	1	18	2	41	2,5	126	7	178	9	198	10
Homogene Eihülle	9	1,5	21	2	34	2,5	112	6	186	9,5	240	12,5
Gesamtaktivität	581		974		1426		1830		2001		2021	

Bei allen Versuchszeiten wurden Ovocyten mit sämtlichen Entwicklungsstadien der Eihülle gleichmäßig beachtet.

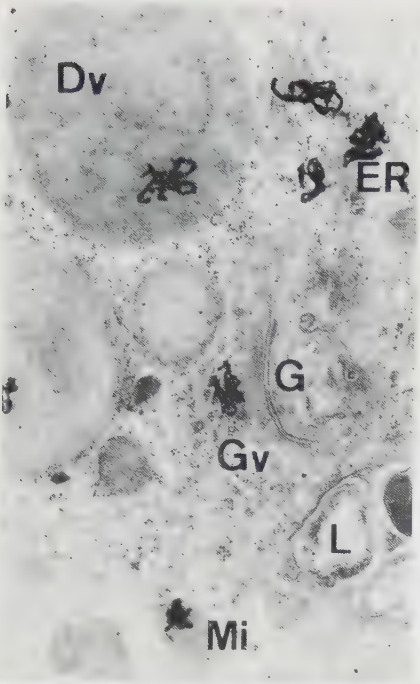
Nach 5 Min. beträgt die Gesamtaktivität ca. einen Viertel des im Gesamtversuch erreichten Maximums. Die Ribosomen beanspruchen 50% der ausgezählten Silberkörner. Die übrige Aktivität verteilt sich hauptsächlich auf das ER, die Golgi-Felder und den Kern (Abb. 12). Das periphere Cytoplasma (Periplasma) mit seinen Proteindotterschollen ist schwach markiert.

Abb. 12. Ovocyten im Stadium B: 10 min nach der 3H-Leucin-Injektion. Markierung der Golgi-Vakuolen (Gv), der Proteindottervorstufen (Dv) und des Ergastoplasmas (ER). G = Golgi-Feld, L = Lysosom, Mi = Mitochondrium; Vergr. 22 200fach.

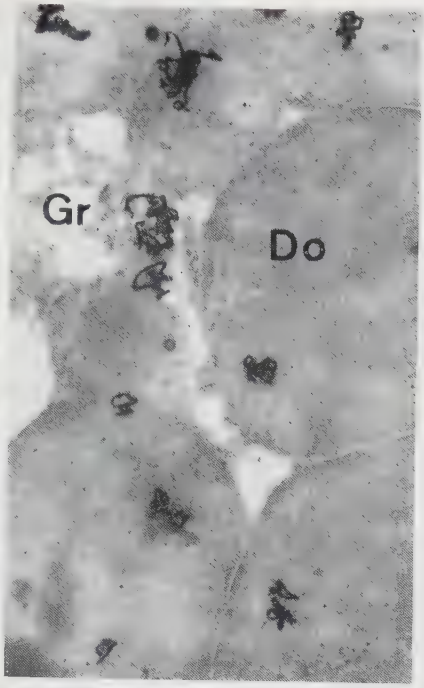
Abb. 13. Stadium B: 15 min nach der Injektion von 3H-Leucin. Vermehrte Markierung der Proteindotteranteile (Do). Gr = Grundcytoplasma; Vergr. 12 100fach.

Abb. 14. Stadium B: 30 min nach der 3H-Leucin-Injektion. Aktivität in den Dottervorstufen (Dv) des Periplasmas und in der Eihülle (Eh). cv = "coated vesicles", Mv = Microvilli; Vergr. 21 800fach.

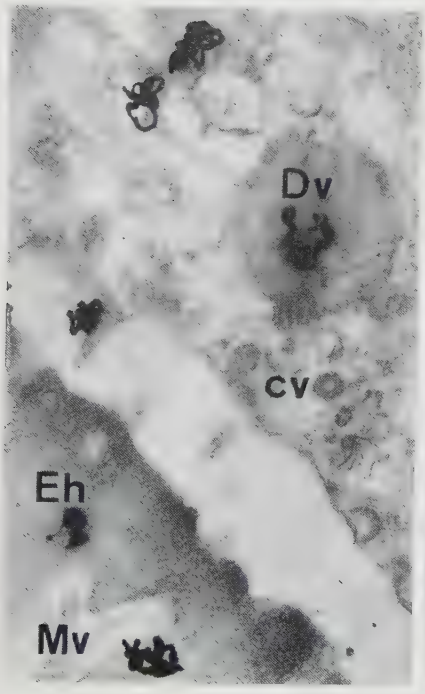
Abb. 15. Stadium B: 60 min nach der Injektion von 3H-Leucin. Deutliche Zunahme der Silberkornfilamente über den Dotterkugeln (Do); Vergr. 15 000fach.



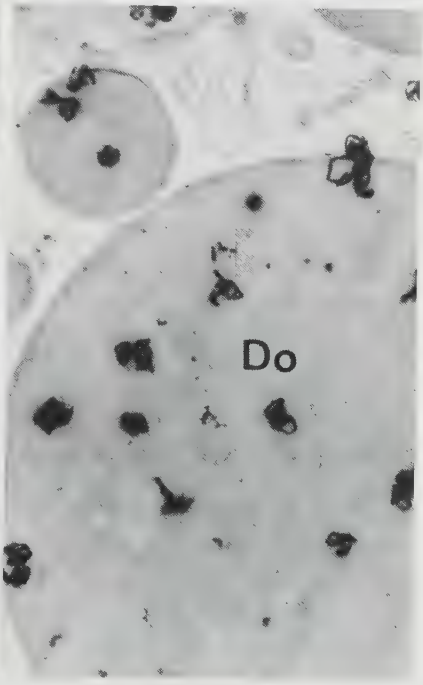
12



13



14



15

15 Min. nach der Injektion ist die Gesamtaktivität massiv angestiegen. Die freien Ribosomen sind stärker markiert. Die Zahl der Silberkörner über dem ER und den Golgi-Feldern hat sich verdoppelt. Die Einbaurate des Tracers in die Eiweißdotterkugeln hat sich ebenfalls erhöht (Abb. 13). Im Kern liegt die Radioaktivität wieder wie unter a. deutlich im Nucleolus. Im peripheren Bereich der Ovocyte ist die Markierung außer im freien Cytoplasma nicht wesentlich angestiegen. Die im Aufbau begriffene Eihülle ist noch äußerst schwach markiert.

Nach 30 Min. ist wiederum ein großer Anstieg der Gesamtmarkierung zu verzeichnen. Vor allem die zentral liegenden freien Ribosomen, das ER, die Golgi-Felder und die Dotterschollen sind stärker markiert. Im Kern sind praktisch nur der Nucleolus und die «corps secondaires» markiert. Letztere liegen zum Teil noch im Nucleolus oder schon im Karyoplasma. Die im äußeren Teil des Cytoplasmas liegenden Dotterschollen zeigen eine schwach ansteigende Markierung, ebenso die Eihülle (Abb. 14).

Nach 60 Min. hat sich die Gesamtmarkierung nochmals erhöht. Die Radioaktivität in den Ribosomen hat deutlich abgenommen, während sie im Ergastoplasma nochmals zugenommen hat. Die Einbaurate der markierten Aminosäure in den Golgi-Zonen, den Dottervorstufen und in den homogenen Dotterschollen ist merklich angestiegen (Abb. 15). Die Anzahl der Silberkörner über dem Nucleolus hat leicht abgenommen. Im Gegensatz zum Nucleolus ist die Aktivität über den im Karyoplasma liegenden «corps secondaires» im gleichen Zeitabschnitt stark angestiegen. Die deutlichste Veränderung des Einbaumusters ist über der Ovocytenperipherie zu beobachten. Das Grundcytoplasma mit den vielen Pinocytosebläschen ist nun erheblich markiert. Die Aktivität des peripheren Dotters und der Eihülle hat ebenfalls deutlich zugenommen.

Nach 120 Min. ist die Markierung der Ribosomen und des ER im zentralen Bereich der Ovocyte stark vermindert, während sie im selben Teil über den Dotterschollen merklich angestiegen ist. Am klarsten ist wiederum das einheitliche Ansteigen der Aktivität im Periplasma zu erkennen. Diese Zunahme entspricht den Ergebnissen von oben.

Nach 240 Min. hat die Gesamtaktivität ein Maximum erreicht. Die Veränderungen des Einbaumusters der markierten Proteinverbindungen in den einzelnen Zellkompartimenten lassen sich folgendermaßen beschreiben: starke Abnahme der Aktivität in den freien Ribosomen, im ER und in den Golgi-Zonen. Im Gegensatz dazu nimmt die Markierung in den zentral liegenden Dotterschollen nochmals erheblich zu. Über dem peripheren Cytoplasma hat die Anzahl der Silberkörner abgenommen. Dagegen ist wiederum ein Anstieg der Markierung in den im selben Bereich liegenden Dotterkugeln zu erkennen. In der Eihülle ist die Einbaurate des 3H-Leucins erneut erhöht worden.

6 Std. nach der Injektion zeigen die Ovocyten folgendes Einbau-

muster des Tracers: die Gesamtaktivität hat sich nur unwesentlich erhöht. Im Zentrum liegt praktisch die gesamte Aktivität in den homogenen Dotterschollen (Abb. 16). Dasselbe Einbaumuster zeigt sich auch peripher, wo im Cytoplasma eine kleine Restmarkierung zu beobachten ist, während die darin liegenden Dotterkugeln eine massive Radioaktivität zeigen. Auch über der Eihülle liegt eine, im Vergleich zu 240 Min., leicht erhöhte Anzahl von Silberkörnern.

c. Injektionsversuch mit radioaktiver Hämolymphe (= «heiße» Hämolymphe)

Kurz vor der Sektion für die Versuche a. und b. wurde der jeweilige «heiße» Hämolymphtropfen (vgl. S. 107) dieser Zecken in die isotopenfreie Hämolymphe einer zweiten Tierserie injiziert. Die fremde Hämolymphe rief keine schädigende Wirkung in den Ovocyten hervor.

Die Einbauraten des Tracers in die Ovocyten der zweiten Serie wurden nicht durch Auszählen der Silberkörner ausgewertet. Die jeweiligen Einbaumuster sollen hier nur deskriptiv dargestellt werden. Allgemein wurde eine massive Abnahme des zur Verfügung stehenden Isotops mit fortschreitendem Alter der injizierten Hämolymphe festgestellt. Das Alter bezieht sich auf die Dauer des Aufenthalts der Hämolymphe im ersten Tier.

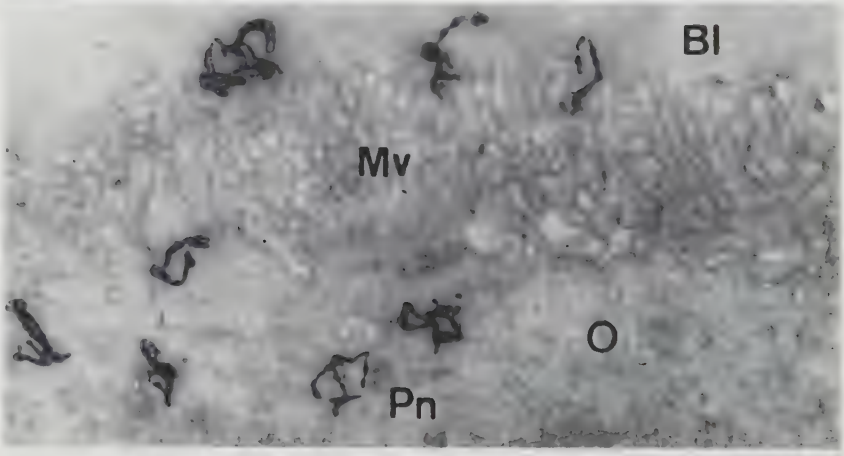
Bei der Injektion von 5 Min. alter Hämolymphe nahmen sämtliche Ovocyten den Tracer in derselben Verteilung wie unter a. und b. auf. Dasselbe gilt auch für injizierte Hämolymphtropfen, die das 3H-Leucin bereits während 15 Min. im Hämocoel der ersten Zecken enthielten.

Markante Unterschiede zu Versuch a. und b. treten erst auf, wenn 30 Min. alte Hämolymphtropfen injiziert werden. Dabei zeigt es sich, daß Ovocyten, die am Anfang der Vitellogenese stehen, merklich schwächer markiert sind als ältere Ovocytenstadien mit ausgeprägter Pinocytose und aktivem Aufbau der Dottersubstanzen.

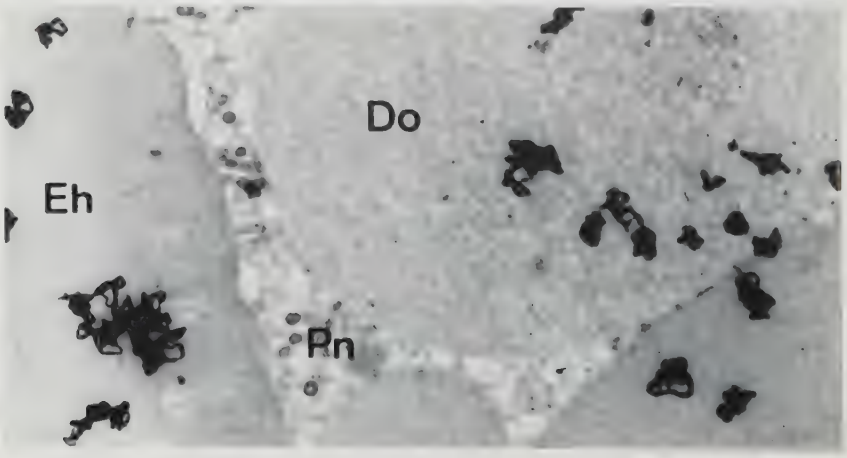
Bei der Verwendung von 60 Min. alter Hämolymphe wird der Unterschied noch deutlicher. Ovocyten im Stadium A sind praktisch unmarkiert, während bei älteren Ovocyten im Stadium B eine starke periphere Markierung zu beobachten ist (Abb. 17). In Autoradiogrammen, die Ovocyten von Zeckenweibchen enthalten, in deren Hämolymphe zusätzlich 120 Min. alte «heiße» Hämolymphe injiziert wurde, sind junge Ovocyten unmarkiert. Bei älteren Eizellen liegt ungefähr dieselbe Anzahl Silberkörner wie oben über der Eihülle und den peripheren Dotterschollen (Abb. 18). Zentrale Bezirke der Ovocyte mit Kern, Cytoplama und Dotterschollen sind unmarkiert. Bei der Verwendung von 240 Min. alter Hämolymphe ergeben sich dieselben Einbaumuster wie eben aufgezählt, nur sind die Einbauraten erheblich kleiner.

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß die Markierung der

16



17



18

Mitochondrien in allen Versuchsserien, in denen eine Cytoplasmaaktivität vorhanden ist, relativ schwach und konstant war. Die gleichbleibende Aktivität läßt darauf schließen, daß das 3H-Leucin in den Mitochondrien zu kompartimenteigenen Strukturproteinen eingebaut wird (Bergeron & Droz 1969).

d. Analyse der Einbaumuster

Die Zecken besitzen keinen Fettkörper, wie die Insekten (Bodnaryk & Morrison 1968; Coles 1965; Engelmann 1969; Laufer 1960; Luescher et al. 1969; Pan et al. 1969; Wyss-Huber & Luescher 1967), in dem die Synthese der Hämolymphproteine stattfindet. Roth & Porter (1964) beschreiben die Darmzellen bei *Aedes aegypti* als möglichen Syntheseort. Diehl (1970) vermutete, daß bei *O. moubata* ebenfalls die Epithelzellen des Darmes eine dominierende Rolle beim Aufbau der Hämolymphproteine spielen könnten.

Unser Versuch zeigt, daß das injizierte 3H-Leucin äußerst rasch in den Darmepithelzellen in Proteine eingebaut wird. Die Markierung der Darmzellen überwiegt quantitativ eindeutig sämtliche Einbauraten des Tracers in andere Zeckengewebe mit Ausnahme des Ovars. In den untersuchten Darmepithelzellen steigt die Markierung bei gleichen Versuchsbedingungen, d. h. bei gleichen Dosen, regelmäßig an und erreicht nach 60 Min. ein Maximum. Nach längeren Inkubationszeiten sinkt die Aktivität wieder, wie bereits erwähnt, deutlich ab. Dies bedeutet, daß einerseits ein möglicher Abbau der markierten Proteine und andererseits wahrscheinlich die Ausschleusung von aktiven Stoffen den Einbau von 3H-Leucin überwiegen. Die für den Einbaunachweis benötigte freie markierte Aminosäure ist im Zeckenkörper nicht mehr vorhanden. Die Ermittlung dieser Verfügungszeit von 60 Min. ist für die Beurteilung des Einbaumusters des Tracers in die Ovocyten von großer Bedeutung, insbesondere dann, wenn die Transportvorgänge höhermolekularer markierter Proteine ermittelt werden sollen.

Wie aus den Tabellen 1 und 2 zu ersehen ist, unterscheiden sich die Einbaumuster des Tracers in den Ovocyten kurz nach der Befruchtung und Begattung (Stadium A) prinzipiell von Ovocyten, in denen die Synthese des Dotters einen hohen Grad erreicht hat (Stadium B). Zu-

---

Abb. 16. Stadium B: 6 Stunden nach der Injektion von 3H-Leucin befindet sich praktisch die gesamte Aktivität in den reifen Proteindotterkugeln (Do) des Reticuloplasmas. Gr = Grundcytoplasma; Vergr. 15 000fach.

Abb. 17. Frühes Stadium B: Die Injektion von 60 min alter «heißer» Hämolymphe zeigt nach 1 min eine starke periphere Markierung der Ovocyte (O). Bl = Basallamina, Mv = Microvilli, Pn = Pinocytosevesikel; Vergr. 24 000fach.

Abb. 18. Spätes Stadium B: 5 min nach der Injektion von 120 min alter Hämolymphe werden nur noch die Eihülle (Eh) und die peripheren Proteindotteranteile (Do) markiert. Pn = Pinocytosevesikel; Vergr. 15 000fach.

dem sind deutliche Unterschiede zwischen Kurz- und Langzeitinkubationen zu erkennen.

Das Einbaumuster in den Ovocyten des Stadiums A zeigt, daß die initielle Synthese von Dotterproteinen an den vielen freien Ribosomen des Ooplasmas stattfindet. Es ist bekannt, daß die Ribosomen einen wesentlichen Syntheseort für Proteine darstellen (Sirlin 1963; Hultin 1964). Bis zu 30 Min. ist ein deutlicher Anstieg der Aktivität in diesen Zellkompartimenten sichtbar. Während derselben Zeit hat die Markierung auch im ER, welches nur wenig mit Ribosomen besetzt ist, verzögert zugenommen. Die nachfolgende Aktivitätsabnahme in den freien Ribosomen und die gleichzeitig anhaltende Zunahme der Markierung im ER deuten darauf hin, daß eine Verschiebung von markierten Proteinen von den Ribosomen ins ER stattgefunden hat. Vom ER gelangen die markierten Stoffe in die Golgi-Zonen, in denen die Einbauraten des Tracers auch nach dem Abklingen der Aktivität in den freien Ribosomen und im ER vorerst noch zunehmen. Wie das eingebaute 3H-Leucin vom ER in die Golgi-Vakuolen gelangt, ist unbekannt (Rohr & Sigwart 1967). Eventuell gelangt es in abgeschnürten Teilen des glatten ER als Vesikel in die Golgi-Vakuolen, oder der Austausch geschieht an den Kontaktstellen des ER mit dem Golgi-Feld. Die fehlende Markierung der Golgi-Lamellen bestätigt die Annahme anderer Autoren (Revel & Hay 1963; Rohr & Bremer 1967; Schmalbeck & Rohr 1967), daß es sich bei den Lamellen um ein Membranreservoir handelt.

Die generelle Funktion des Golgi-Feldes wurde von mehreren Autoren beschrieben (Beams & Kessel 1968; Mollenhauer & Whaley 1963). Neben einer Kondensationsfunktion für neugebildete Stoffe (Rohr & Sigwart 1967) wurde den Golgi-Zonen in verschiedenen Zellen auch eine Synthesefunktion für Mucopolysaccharide zugewiesen (Rohr & Walter 1966; Schmalbeck & Rohr 1967; Dhainaut 1968; Thiery 1969). In den Ovocyten von *O. moubata* könnten die Golgi-Felder die Funktion einer Schaltstelle haben, die die verschiedenen Stoffe kondensiert und an die proteinhaltigen Dottervorstufen weiterleitet.

Aus den Golgi-Zonen gelangen die markierten Proteine mittels Vesikel in die Dottervorstufen, die ganz zu Beginn als multivesiculate bodies auftreten.

Die Frage, ob eine direkte Beschickung der Dottervorstufen mit Proteinen aus dem agranulären ER, unter Umgehung des Golgi-Apparates, wie sie Beams & Kessel (1963) in Flußkrebsovocyten beschrieben, hier ebenfalls möglich wäre, kann anhand des autoradiographischen Versuches nicht eindeutig beantwortet werden. Ein Hinweis auf diese kurze Transportmöglichkeit wäre die bereits nach 5 Min. auftretende Markierung einzelner Dottervorstufen.

Interessant erscheint das nach 60 Min. erreichte Maximum der Gesamtaktivität im Zusammenhang mit der zur gleichen Zeit zu Ende gehenden Verfügungszeit der freien markierten Aminosäure. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Ovocyten im Stadium A keine Möglichkeit haben, den nur noch als höhermolekularen Stoff in der Hämolymphe vorkommenden Tracer in wesentlichen Mengen aufzunehmen. Die Differenzierung des Oolemmas, die sich im Stadium B in der Bildung von Microvilli und in den Pinocytosevorgängen ausdrückt, hat noch nicht stattgefunden. Diese Differenzierungsvorgänge sind erst im Aufbau begriffen und funktionieren noch nicht. Einzig die in die Invaginationen des Oolemmas im Stadium A eingedrungenen höhermolekularen Stoffe haben die Möglichkeit, während der vesikulären Auflösung dieser Membraneinstülpungen ins Eicytoplasma zu gelangen (siehe Ferritinversuch).

Das Einbaumuster der Inkubationszeiten 60 Min. bis 6 Std. zeigt, daß sich die Markierung aus den Golgi-Zonen in die Dottervorstufen weiterverschoben hat. Die Abnahme der Kernaktivität läßt darauf schließen, daß eine Abgabe von markierten Stoffen aus dem Kern ins Eicytoplasma stattgefunden hat.

Das Einbaumuster des 3H-Leucins in die Ovocyten im Stadium B ist bis zu 30 Min. ähnlich dem der Ovocyten im Stadium A. Nach 30 Min. treten Unterschiede auf, weil sich zwei verschiedene Einbaumuster überlagern. Das erste Einbaumuster wird durch die Aufnahme und den Einbau der freien markierten Aminosäure gebildet. Das zweite Einbaumuster stellt den Transport und den Einbau von radioaktiven Proteinen aus der Hämolymphe dar. Da durch die im Stadium B an der ganzen Oolemmaoberfläche auftretenden Pinocytosevorgänge eine Aufnahmemöglichkeit für höhermolekulare Stoffe vorhanden ist, läßt sich die Erhöhung der Gesamtaktivität auch nach 60 Min. erklären. Im Zusammenhang mit der Verfügbarkeit der 3H-Aminosäure von 60 Min. kann weiter daraus geschlossen werden, daß die Ovocyte für den Aufbau ihrer Dottersubstanzen bereits anderswo synthetisierte Stoffe aus der Hämolymphe aufnimmt.

Die Schwankungen der Aktivitätsverteilung in den Ovocyten im Stadium B werden nach 30 Min. einerseits von endogenen Synthesevorgängen der Tracers in der Eizelle und anderseits von Transportvorgängen des exogen eingebauten 3H-Leucins in die Ovocyte bestimmt.

Eine dominierende Rolle spielt zu Beginn die Markierung der Ribosomen, die nach dem Erreichen ihres Maximums nach 30 Min. stark abnimmt. Wiederum lassen sich deutlich die zeitlich aufeinanderfolgenden Aktivitätsphasen der Ribosomen, des agranulären ER, der Golgi-Felder und des Proteindotters im zentralen Bereich des Ooplasmas unterscheiden.

Die einzelnen Silberkörner über den homogenen Proteindotterkugeln

nach Kurzzeitinkubationen weisen darauf hin, daß die markierten Proteine sehr rasch in ältere Dotterkugeln eingelagert werden können.

Die zeitlichen Unterschiede der Kernaktivität lassen sich folgendermaßen interpretieren: die Markierung des Karyoplasmas ist während des ganzen Versuches praktisch konstant. Dem bei 30 Min. auftretenden Minimum im Karyoplasma steht das zu dieser Zeit erreichte Maximum der Markierung im Nucleolus gegenüber. Die Aktivität des letzteren nimmt anschließend wiederum gleichmäßig ab. Es ist bekannt, daß Nucleoli Aminosäure in Proteine einbauen können (Allfrey 1963; Hay 1968; Leblond & Amano 1962; Prescott 1962). Bernhard & Granboulan (1968) zeigten diesen Einbau mit Hilfe von radioaktiven Aminosäuren, ebenso Meng (1970).

Die bisher ungeklärte Frage nach der Entstehung der Nebenkörper oder «corps secondaires» (Aeschlimann & Hecker 1969; Diehl 1970), die übrigens auch in anderen Ovocytenkernen beobachtet wurden (Austin 1961; Esper 1965; Raven 1961), kann im Zusammenhang mit der Autoradiographie ultrastrukturell teilweise beantwortet werden. In den «Vakuolen», des aus filamentösen und granulären Elementen bestehenden Nucleoluscortex, kann das Auftreten dieser granulären Nebenkörper (Abb. 19) und deren Ausschleusung ins Karyoplasma verfolgt werden (Abb. 20). In den nach Diehl (1970) aus Ribonucleoproteinen bestehenden «corps secondaires» wird durch den Einbau des 3H-Leucin die Proteinkomponente bestätigt. Im Karyoplasma wandern diese Körper in die Nähe der Kernmembran, wo sie zerfallen und vermutlich durch die Kernporen ins Cytoplasma ausgeschleust werden (Abb. 21, 22).

Demnach nimmt der Nucleolus aktiv durch die Abgabe von ribosomalem Material indirekt an der endogenen Proteinsynthese teil. Die Passage von Ribonucleoproteinen durch Kernporen wird von Miller (1962) und Stevens & Swift (1966) in anderen Zelltypen ultrastrukturell nachgewiesen. Eine ähnliche Emissionsform des Nucleolus fand Anderson (1964) in den Ovocyten von *Periplaneta americana*. Mas-

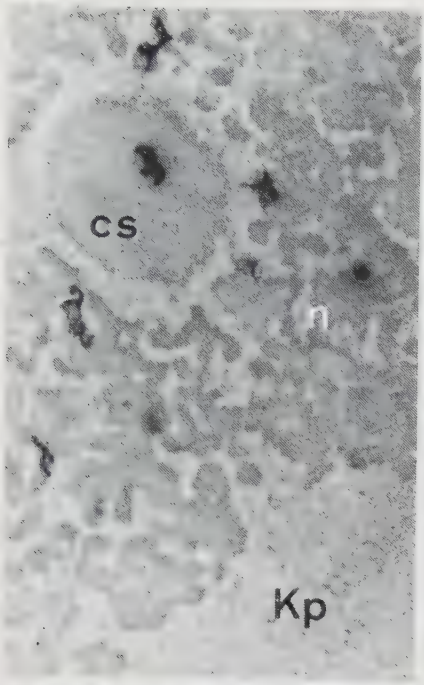
---

Abb. 19. Stadium B: Ausschnitt aus dem Nucleoluscortex (n) 30 min nach der Injektion von 3H-Leucin. Die Markierung konzentriert sich um einen in einer «Vakuole» liegenden «corps secondaire» (cs). Ein Silberkornfilament ist über diesem Nebenkörper zu erkennen. Kp = Karyoplasma; Vergr. 15 000fach.

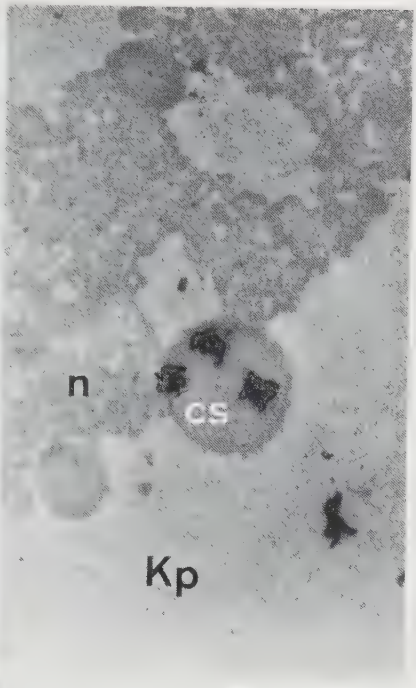
Abb. 20. Stadium B: Austritt eines markierten Nebenkörpers (cs) aus dem Nucleoluscortex (n) ins Karyoplasma (Kp); Vergr. 18 000fach.

Abb. 21. Stadium B: Zerfall eines «corps secondaire» (cs) in der Nähe der Kernmembran (Km). Die Markierung liegt in dem sich auflösenden Nebenkörper und im elektronendichter erscheinenden Karyoplasmateil (Kp). Cp = Cytoplasma; Vergr. 15 000fach.

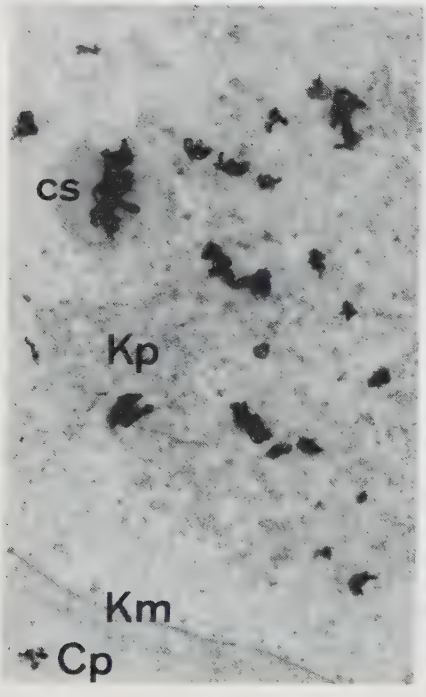
Abb. 22. Stadium B: Markierung des elektronendichten Materials → auf beiden Seiten der Kernmembran (Km). Cp = Cytoplasma, Do = Dotterscholle, Kp = Karyoplasma, L = Lipidtropfen; Vergr. 18 00fach.



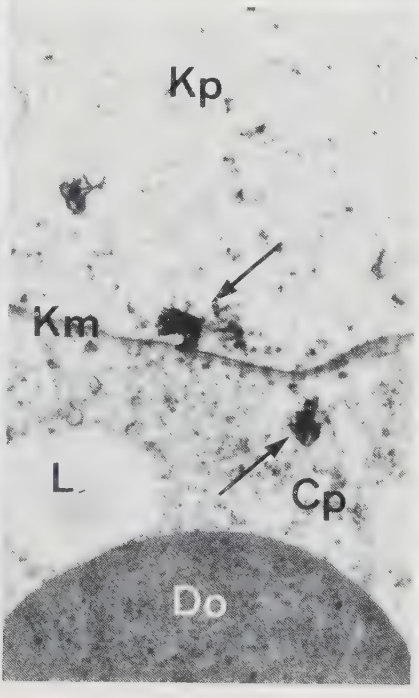
19



20



21



22

SOVER (1968) und WARTENBERG (1962) beschrieben ähnliche Ausschleusungsvorgänge in den Eizellen von Amphibien. HECKER & AESCHLIMANN (1970) fanden eine Substanzabgabe des Ovocytenkerns ins Ooplasma bei *Rhipicephalus bursa*. Den Einbau solcher Partikeln in Ribosomen beobachtete KESSEL (1966a) in den Ovocyten von *Ciona intestinalis*.

Die, vor allem nach 30 Min., durch die Aufnahme von Hämolymphproteinen verursachte Zunahme der Gesamtmarkierung beeinflußt in erster Linie das Einbaumuster in der Ovocytenperipherie. Daß es sich dabei um Proteine handelt, beweisen die Inkubationsversuche mit «heißer» Hämolymple. Dabei werden Ovocyten im Stadium A nach 60 Min. nicht mehr markiert, während Eizellen im Stadium B eine starke periphere Aktivität in der Eihülle und in den Randdotterkugeln zeigen. Neben dem Einbau von Hämolymphproteinen in die Eihülle werden Proteine ins Ooplasma aufgenommen, wo sie im Randbereich der Ovocyten liegen bleiben und nicht weiter ins Innere gelangen, wie längere Inkubationszeiten zeigten.

Die Funktion des Funiculus in bezug auf die Lieferung von Dottersubstanzen scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von AESCHLIMANN & HECKER (1967) sind einzelne Golgi-Zonen in den Funiculuszellen vorhanden, aber ihre Markierung durch 3H-Leucin ist äußerst schwach. Die übrige Aktivität in diesen Zellen scheint auf den Einbau des Tracers in zelleigene Strukturproteine hinzuweisen. Zudem bleibt ihre Gesamtaktivität nach dem Erreichen eines Maximums nach 60 Min. konstant.

2. Ferritinversuch

Die Aufnahme des injizierten Ferritins aus der Hämolymphe ist bereits nach 5 Min. *in vivo* und nach 1 Min. *in vitro* in den Stadien A und B nachweisbar. Bei allen Ovocyten befinden sich einzelne Tracermoleküle innerhalb der Basallamina.

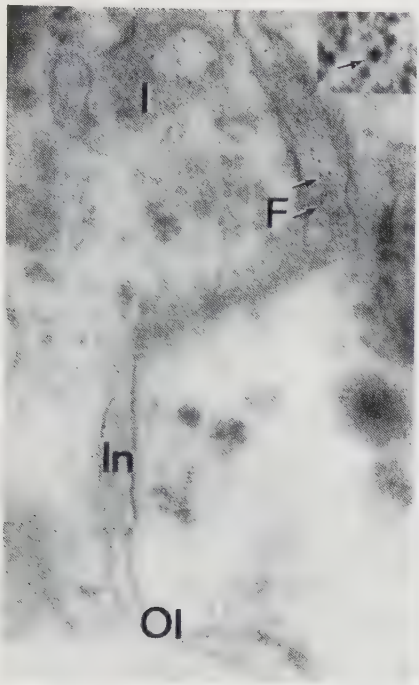
Es ist bekannt, daß die Basallamina keine Schranke für die Diffusion der relativ großen Ferritinmoleküle darstellt (STAY 1965).

Der Weitertransport des Tracers erfolgt je nach dem Reifezustand der Ovocyten ganz verschieden.

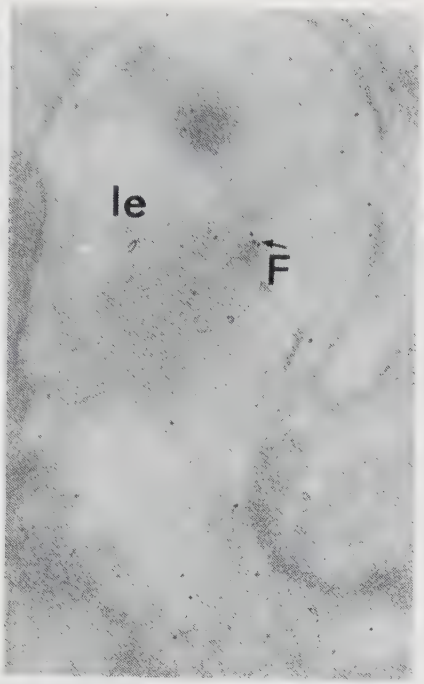
Abb. 23. Stadium A: Eindringen des Ferritins (→F) in eine Oolemmainvagination (In). Ol = Oolemma, I = abgeschnürte Teile der Invagination; Vergr. 54 000fach. Detail der Ferritinmoleküle (→); Vergr. 280 000fach.

Abb. 24. Bläschenartige Ausbildung des Invaginationendes (Ie) vor der Abschnürung; →F = Ferritinmoleküle; Vergr. 80 000fach.

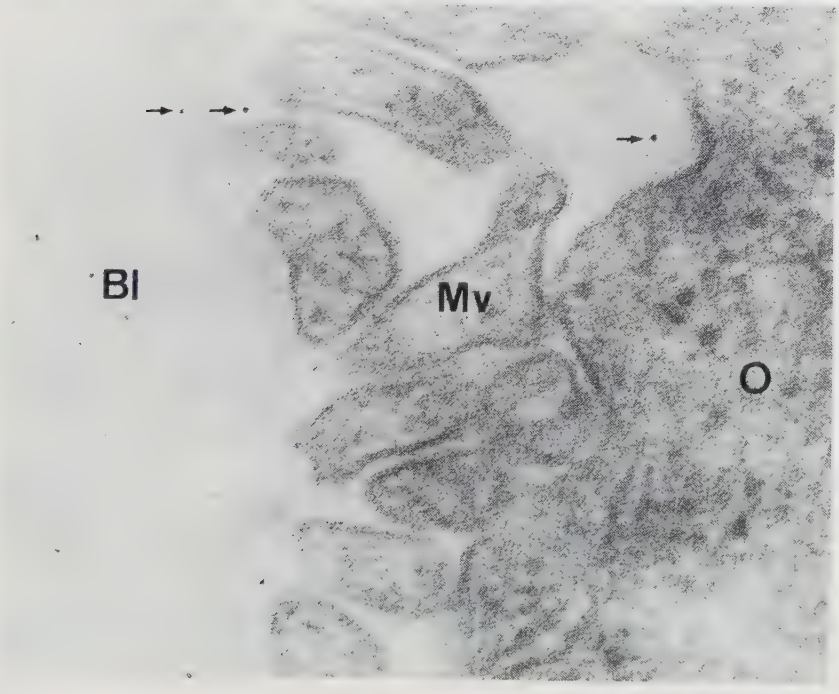
Abb. 25. Stadium A: Die Ferritinmoleküle dringen (→) durch die Basallamina (Bl) und bleiben zwischen den Microvilli (Mv) liegen. O = Ooplasma; Vergr. 120 000fach.



23



24



25

a. Ovocyten im Vitellogenesestadium A.

In Ovocyten ohne abgeschlossene Microvilliausbildung und Pinocytosevorgänge weist die Cytoplasmamembran Einstülpungen auf, die während ihres Abbaus in einzelne Vesikel zerfallen.

In diese Invaginationen und Vesikel dringen die Ferritinmoleküle ein und werden dabei während der Abschnürung der Vesikel ins Eicytoplasma aufgenommen (Abb. 23, 24). Die Aufnahme von Ferritin mittels ähnlicher Membraninvaginationen wurde von verschiedenen Autoren (Farquhar & Palade 1962; Maunsbach 1963; Rosenbluth & Wissig 1963; Roth & Porter 1963) in anderen Zelltypen beschrieben.

Die Vesikel verbleiben im peripheren Bereich der Ovocyte. Eine Fusion unter sich oder die Abgabe des eingeschlossenen Materials an ein Zellkompartiment kann nicht beobachtet werden.

Nach dem Verschwinden der Cytoplasmaeinstülpungen werden die Microvilli gebildet. Während dieses Reifestadiums bleibt das durch die Basallamina eingedrungene Ferritin zwischen den noch wenig ausgebildeten Microvilli liegen und wird nicht ins Cytoplasma der Ovocyte aufgenommen (Abb. 25). Ein Durchdringen der Cytoplasmamembran ist den Tracermolekülen nicht möglich.

Der Versuch zeigt, daß die Aufnahme von höhermolekularen Stoffen in diesem Stadium nur beschränkt möglich ist. Nämlich dann, wenn einzelne Oolemmainvaginationen noch vorhanden sind, durch die wenige Ferritinmoleküle ins Ovocyteninnere gelangen können.

b. Ovocyten im Vitellogenesestadium B.

Nach dem Durchdringen der Basallamina wandern die Ferritinmoleküle zwischen den fertig ausgebildeten Microvilli und der sich weiter

---

Abb. 26–40: Ovocyten im Stadium B.

Abb. 26. Eindringen des Ferritins (→F) durch die Kanäle zwischen den Microvilli (Mv) und den Eihüllensegmenten (Eh); Vergr. 120 000fach.

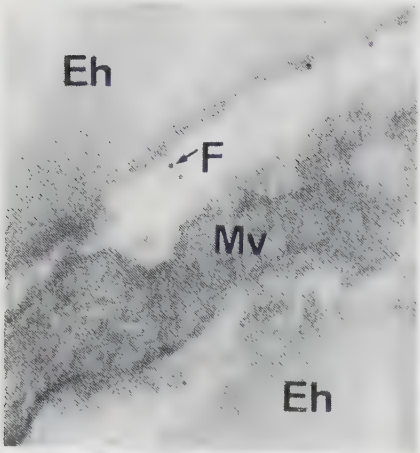
Abb. 27. Nach dem Erreichen der Microvillibasis dringen die Ferritinmoleküle (→F) in den Raum zwischen Oolemma (Ol) und Eihülle (Eh). O = Ooplasma; Vergr. 80 000fach.

Abb. 28. Anlagerung des Ferritins (→F) zusammen mit anderem elektronendichtem Material an die Oolemmaaußenseite. Das Oolemma zeigt typische kleine Invaginationen (In), die dem Pinocytosevorgang vorausgehen. Eh = Eihülle, O = Ooplasma; Vergr. 80 000fach.

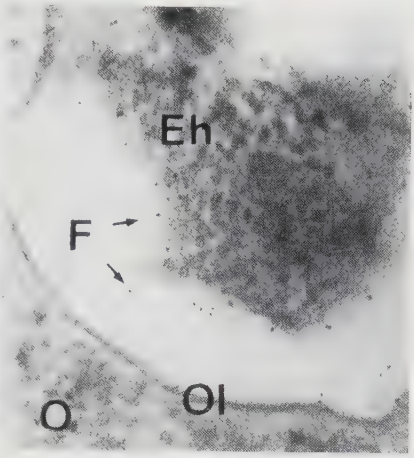
Abb. 29. Pinocytosevesikel kurz vor der Abschnürung. F = Ferritinmoleküle, O = Ooplasma; Vergr. 280 000fach.

Abb. 30. Abgeschnürtes Pinocytosebläschen (P) mit eingeschlossenen Ferritinmolekülen (→F). Eh = Eihülle, O = Ooplasma; Vergr. 72 000fach.

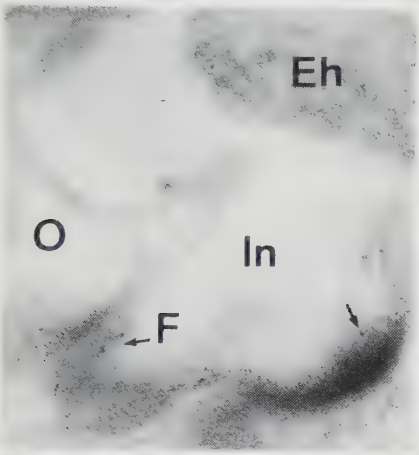
Abb. 31. Ins Periplasma (O) einwandernde Pinocytosebläschen mit Ferritinmolekülen (F); Vergr. 120 000fach.



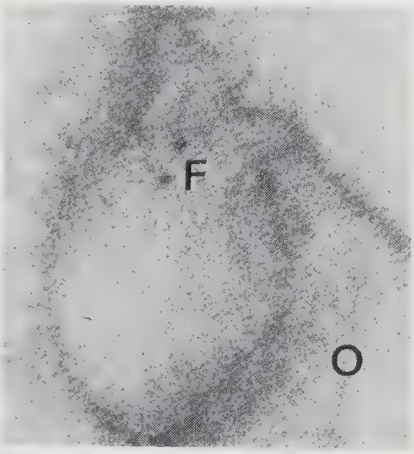
26



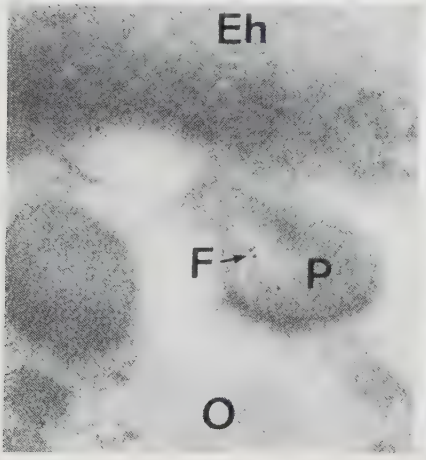
27



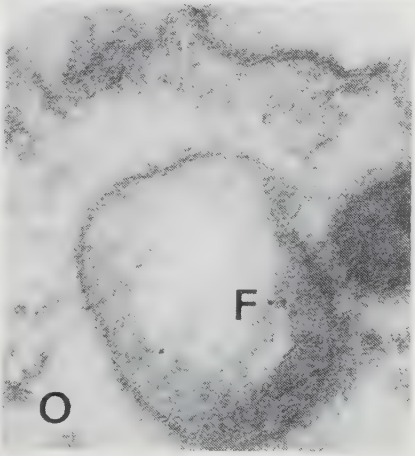
28



29



30



31

im Aufbau befindlichen Eihülle hindurch (Abb. 26). Ein Eindringen der Markierung in die Microvilli kann nicht beobachtet werden.

An der Basis des Microvillisaumes verschieben sich die einzelnen Ferritinmoleküle in den Raum zwischen Oolemma und den Eihüllesegmenten (Zone I nach HECKER 1970a) (Abb. 27). Diese Zone kann als Anreicherungs- und Kontaktzone für eingedrungene Stoffe interpretiert werden, da sich das Ferritin nach einem kurzen Aufenthalt in diesem Raum sehr eng an das Oolemma anlagert (Abb. 28).

Anschließend erfolgt der Pinocytosevorgang, indem die Tracermoleküle zusammen mit anderem elektronendichtem Material in die sich von der Ovocytenmembran ablösenden «coated vesicles» (ROTH & PORTER 1962) eingeschlossen werden und darin ins Cytoplasmainnere gelangen (Abb. 29, 30, 31, 32). Der durchschnittliche Durchmesser der Pinocytosebläschen beträgt 0,18–0,23 μ. Auf der Membranaußenseite ist nach dem Ablösen der Vesikel der «coat» noch kurze Zeit vorhanden. Während der Einwanderung dieser Micropinocytosebläschen ins Cytoplasmainnere verschwindet dieser «coat». Eine ähnliche Beobachtung machten ROTH & PORTER (1964) in den Ovocyten von *Aedes aegypti*. Die Vesikel beginnen im peripheren Cytoplasmabereich zu fusionieren und bilden Dottervorstufen (Abb. 33, 34). Zum Teil stehen diese Formen in einem engen Zusammenhang mit Teilen des agranulären ER (Abb. 35). Durch weitere Anlagerungen entstehen wachsende Dotterformen, deren Membranen sich mehr und mehr straffen, bis runde Dotterkugeln entstanden sind (Abb. 36). Das Innere dieses Proteindotters scheint am Anfang eine unterschiedliche Dichte aufzuweisen. Nach dem Erreichen einer gewissen Größe wird die Dottermatrix

---

Abb. 32. Im Periplasma liegende primäre Verschmelzungsform (Vf) von Micropinocytosebläschen. F = Ferritinmoleküle, Ol = Oolemma; Vergr. 100 000fach.

Abb. 33. Weitere Verschmelzung von Pinocytosebläschen mit elektronendichtem Inhalt und Ferritin (→F) zu Dottervorstufen; Vergr. 100 000fach.

Abb. 34. Bildung von größeren Fusionsformen (Vf) durch die Vereinigung von weiterem durch Pinocytose aufgenommenem Material. →F = Ferritin; Vergr. 120 000fach.

Abb. 35. Die Dottervorstufen (Dv) stehen oft in Verbindung mit Teilen des agranulären ER. →F = Ferritinmoleküle; Vergr. 80 000fach.

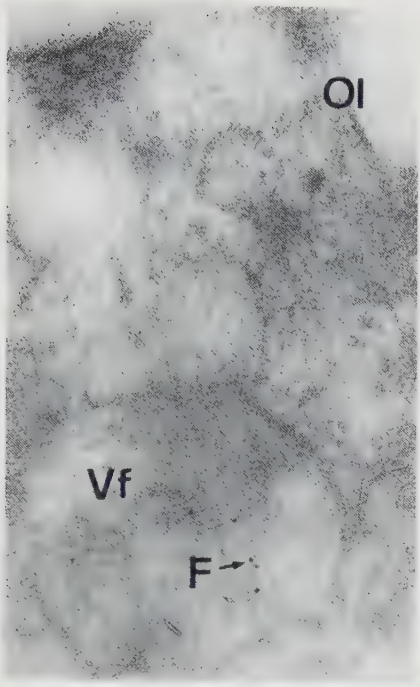
Abb. 36. Durch Straffung der Membranen entstehen runde Dottervorstufen (Dv) mit homogenem Inhalt und Ferritin (→F). O = Ooplasma; Vergr. 80 000fach.

Abb. 37. Dotterkugel (Do) mit elektronendichteren peripheren Stellen und Ferritinkonzentration (→F). O = Ooplasma; Vergr. 80 000fach.

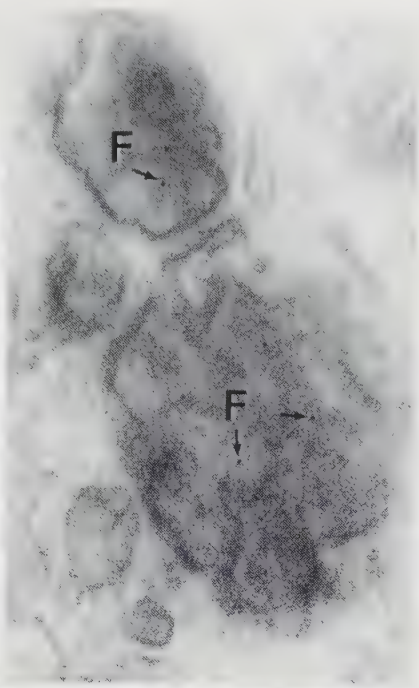
Abb. 38. Dotterkugel (Do) mit gleichmäßig verteilten Ferritinmolekülen (→F). O = Grundcytoplasma; Vergr. 80 000fach.

Abb. 39. Eihüllenschollen mit zunächst noch peripheren Ferritinanhäufungen (F) in der Zone III. II = Zone II, Mv = Microvilli; Vergr. 60 000fach.

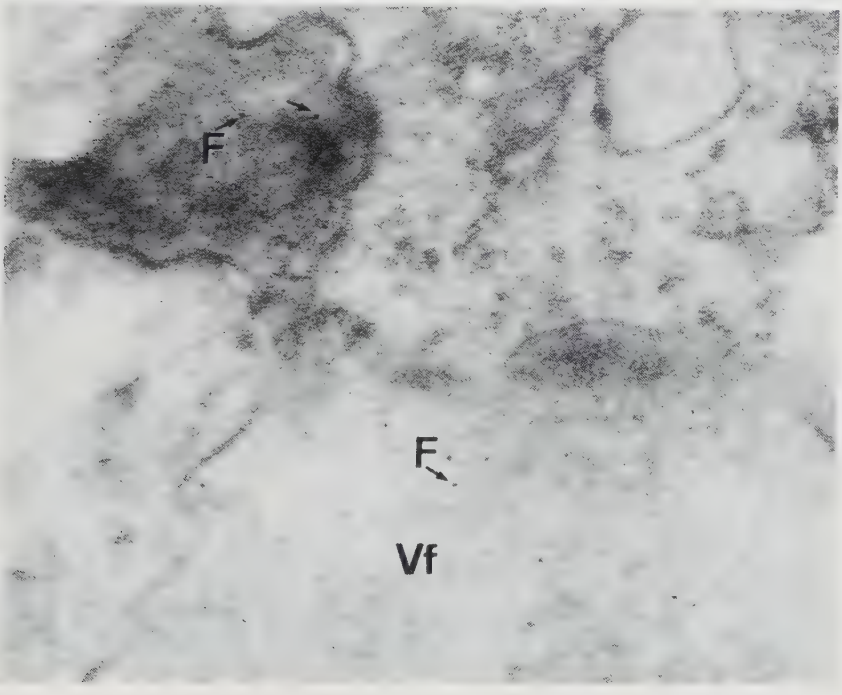
Abb. 40. Homogene Ferritinmarkierung (F) der Zone III. Bl = Basallamina, II = Zone II, Mv = Microvilli; Vergr. 80 000fach.



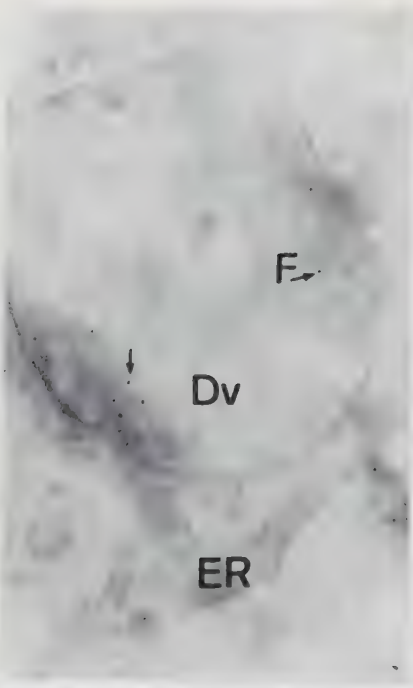
32



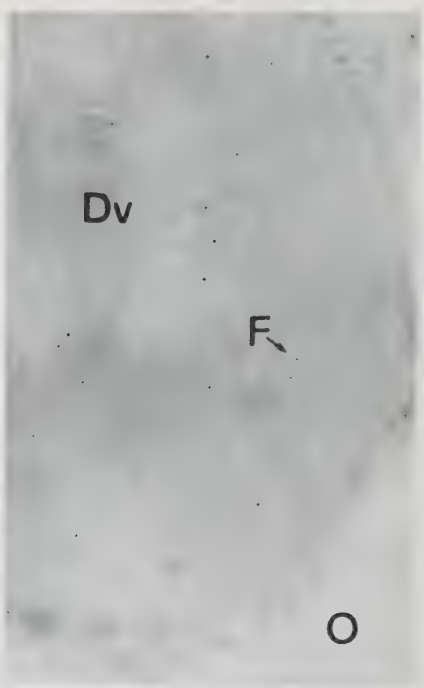
33



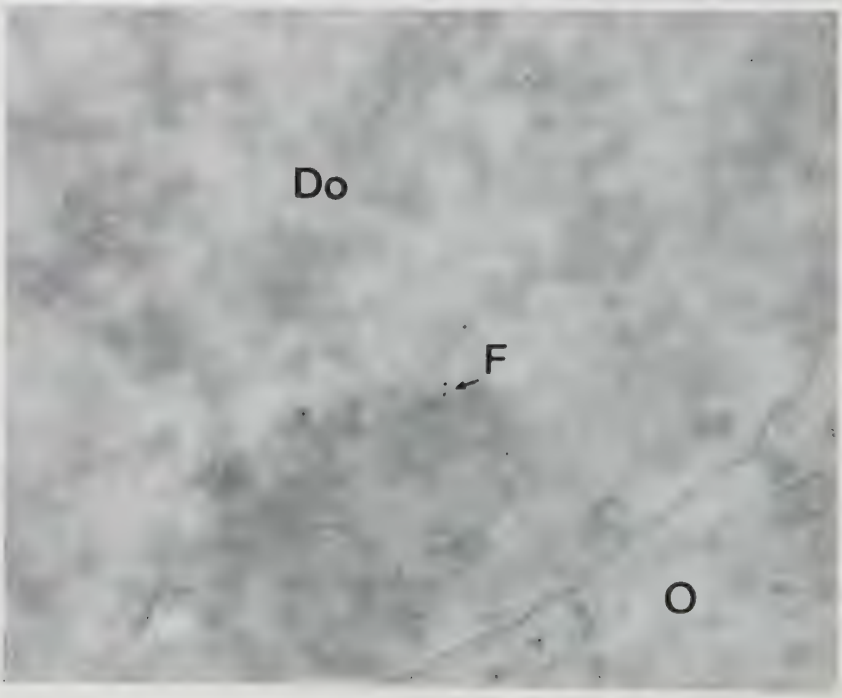
34



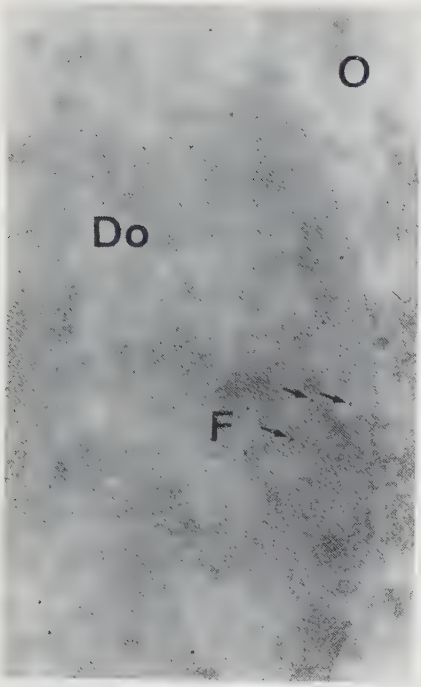
35



36

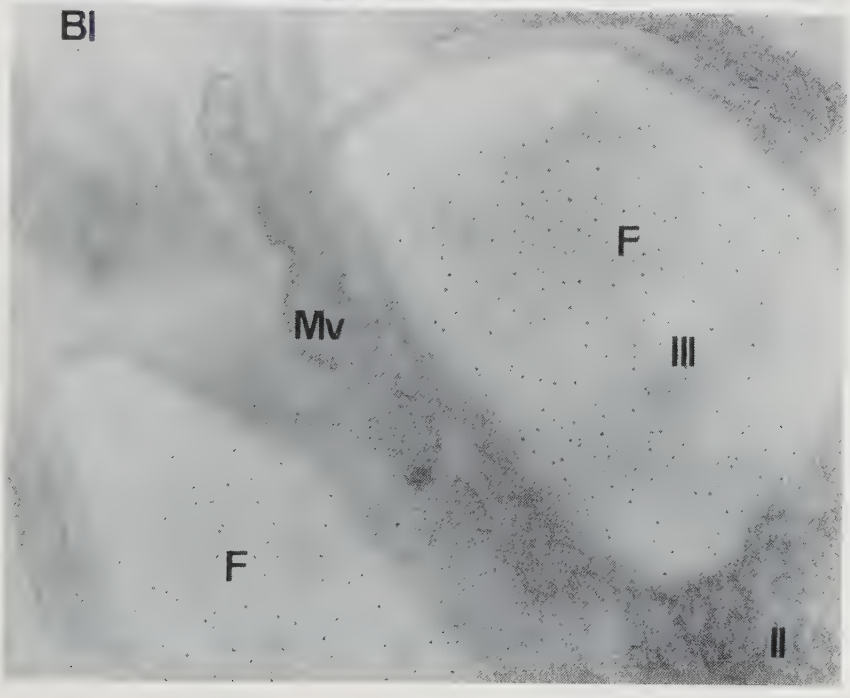


37



38

39



40

homogen und zeigt dieselbe Dichte wie die zum Teil bereits größeren und zentralliegenden Dotterkugeln. Eine Verschiebung des peripher, aus exogenem Material gebildeten Dotters, zwischen den letzteren hindurch nach innen, kann nicht stattfinden, da der Gesamtdotter bereits zu dicht liegt.

Zur gleichen Zeit, wie die eben beschriebenen Verschmelzungsvorgänge, wandern andere Pinocytosebläschen an die Membranen von älteren Dotterschollen und geben ihr Material ins Innere dieser Dotterkugeln ab. Anhäufungen von Ferritinpartikeln lassen sich in den meisten endogen aufgebauten und im peripheren Cytoplasmabereich liegenden Proteindotterschollen erkennen (Abb. 37, 38).

Neben diesen beobachteten Aufnahmevorgängen des Ferritins mittels Micropinocytose beginnen nach 30 Min. einzelne Ferritinmoleküle in die homogene Eihüllenschicht (Zone III nach HECKER 1970a) einzuwandern (Abb. 39). Nach 2 Std. ist diese Zone gleichmäßig mit Ferritin markiert (Abb. 40). Eine Markierung der elektronendichteren Zone II (HECKER 1970a) findet nicht statt. Sie scheint eine Vorstufe der Zone III darzustellen, da sie in der fertig ausgebildeten Eihülle nicht mehr vorhanden ist.

Der Versuch zeigt, daß die homogene Zone III hochmolekulare Proteine aus der Hämolymphe aufnehmen und einbauen kann. Obwohl Ferritin nicht in der Hämolymphe vorkommt, darf doch angenommen werden, daß die mit den Hämolymphproteinen mitlaufenden Ferritinmoleküle den Aufbaumodus der Eihülle und die Herkunft des Einbaumaterials zeigen. Die Eihülle von *O. moubata* wird nicht durch die Ovocyte selbst gebildet, sondern sie entsteht durch die Aufnahme von Stoffen aus der Hämolymphe. Ungeklärt ist die Frage, ob eventuell die beim Abbau der Microvilli freigewordenen Membranteile in die Eihülle eingebaut werden. Dieser Vorgang kann ultrastrukturell nicht beobachtet werden. Doch wäre dies möglich, da in der Zone II membranrestähnliche Strukturen auftreten.

Die Inkubation der Ovocyten mit Ferritin hat neben den aufgezählten Resultaten gezeigt, daß das Ferritin nur in membrangebundener Form ins Cytoplasma aufgenommen und transportiert wird. Dieses Ergebnis stimmt mit denen von anderen Autoren (DANES & STRUTHERS 1961; FARQUHAR & PALLADE 1962; KAY et al. 1962; PAPPAS & TENNYSON 1962; RYSER et al. 1962; WARTENBERG 1964) überein, die sich mit dem Transport von kolloidalen Eisenverbindungen (u. a. Ferritin) in verschiedenen Zelltypen befaßt haben.

Frei im Cytoplasma vorkommende Ferritinmoleküle, wie sie STAY (1965) in der Ovocyte von *Hyalophora cecropia* fand, sind in unserem Versuch nicht zu beobachten.

Interessant ist die Feststellung, daß nach 120 Min. das Angebot des Tracers rasch vermindert wird. Das zeigt sich darin, daß die Basallamina

praktisch unmarkiert bleibt, während an der Basis der Microvilli die Aufnahme des restlichen Ferritins durch Pinocytose anhält.

3. Peroxidaseversuch

Als weiterer Tracer für Proteine wurde Meerrettichperoxidase in die Hämolymphe der Zeckenweibchen injiziert. Die Ergebnisse dieses Experimentes zeigen im wesentlichen eine deutliche Übereinstimmung mit den Resultaten des Ferritinversuches.

Die durch das Reaktionsprodukt der Peroxidase erzielten Markierungen sind jedoch in viel stärkerem Maße sichtbar als die in kleinen Mengen aufgenommenen Ferritinmoleküle. Dagegen werden zum Teil durch die flockige Darstellung der Peroxidase die verschiedenen Membranen ultrastrukturell verwischt dargestellt.

Die Resultate sollen wiederum für die Stadien A und B getrennt aufgeführt werden.

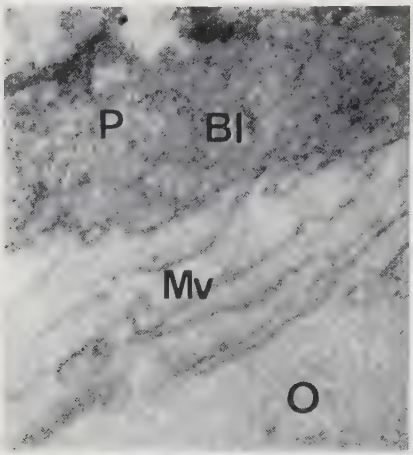
a. Stadium A.

Die Basallamina wird sehr rasch vom Tracer durchdrungen (Abb. 41). Nach 5 Min. ist die Markierung an der Außenseite der sich bildenden Microvillimembranen zu beobachten (Abb. 42, 43). Ein weiteres Eindringen der Peroxidase ins Ooplasma kann nicht, wie beim Ferritinversuch, festgestellt werden. Sie dringt nicht in die bis zu 6 μ tiefen Oolemmainvaginationen ein. Die Bildung der Eihülle, die bei den meisten Ovocyten bereits vor den Pinocytosevorgängen beginnt, wird durch den Einbau des Tracers deutlich dargestellt (Abb. 44). Einzelne, zwischen die Microvilli eingelagerte kleine Eihüllenschollen, sind infolge der Peroxidaseaufnahme dunkel markiert. Ein Einbau des Ferritins in diese Frühstadien der Eihülle findet dagegen nicht statt.

b. Stadium B.

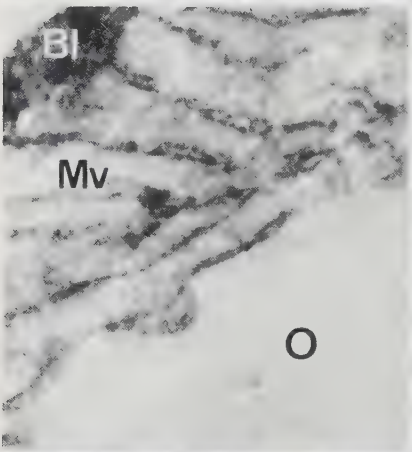
Sobald zu Beginn dieses Stadiums die ersten Micropinocytosevorgänge auftreten, dringt die Peroxidase in die dabei gebildeten wenig tiefen Einstülpungen des Oolemmas ein. Während dem darauffolgenden Abschnüren und Ablösen der Pinocytosevesikel wird die Markierung mit eingeschlossen und gelangt ins Ooplasmainnere (Abb. 45). Dabei ist die Außenseite der Bläschen mit einem «coat» besetzt. Die ersten «coated vesicles» mit dem Reaktionsprodukt sind nach einer Inkubationszeit von 10 Min. sichtbar. Sie bleiben vorerst im peripheren Cytoplasma liegen, ohne miteinander zu verschmelzen oder ihren Inhalt an bereits vorhandene Dotterschollen abzugeben.

In Ovocyten, deren Eihülle bereits durch die Verbindung der einzelnen Eihüllenschollen eine netzartige Struktur aufweist, dringt die

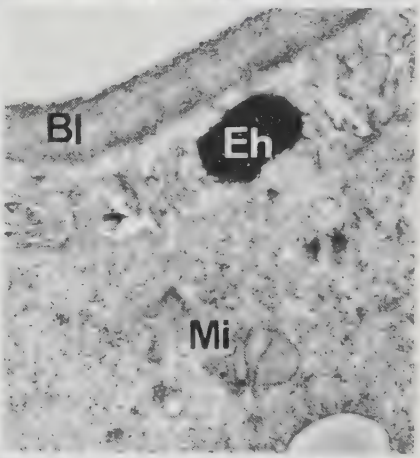


41

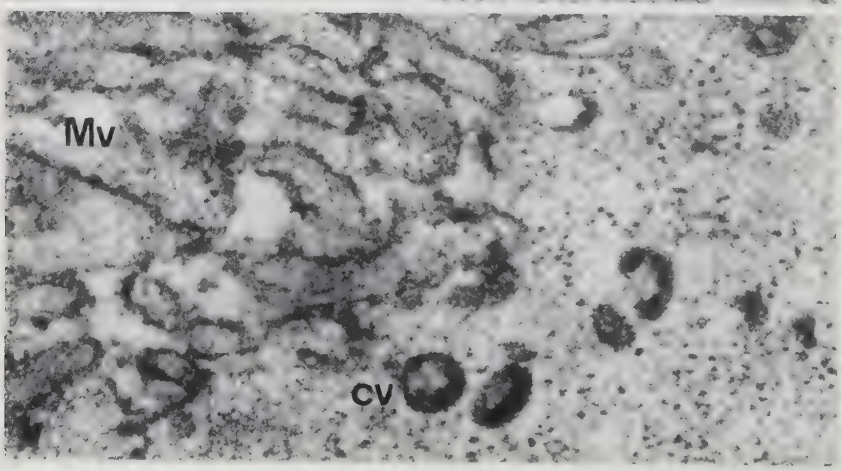
42



43



44



45

Peroxidase innerhalb von 5 Min. in den Kanälen zwischen der Eihülle und den Microvilli an die Microvillibasis und in die Pinocytosebläschen. Die Aufnahme ist in diesem Stadiumabschnitt beschleunigt. Die Anteile der Eihülle sind bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht markiert (Abb. 46).

Nach einer Inkubationszeit von 10 Min. wird die Eihülle ebenfalls durch die Aufnahme der Peroxidase stark geschwärzt. Auffallend ist dabei, daß die Zonen II und III nach 15 Min. und später den Tracer gleichermaßen aufnehmen und nicht mehr zu unterscheiden sind (Abb. 47).

Nur kurz zu Beginn des Peroxidaseeinbaus in die Eihülle wird die Zone II dunkler dargestellt als die Zone III.

Die Zone I ist nach 15 Min. vom Reaktionsprodukt gleichmäßig ausgefüllt (Abb. 48). Anschließend bilden sich konzentrierte Formen der Meerrettichperoxidase, die einen engen Kontakt mit gewissen Oolemmaabschnitten aufnehmen. Das Oolemma zeigt an diesen Stellen leichte Invaginationen, die auf der Ooplasmaseite mit einem «coat» besetzt sind (Abb. 49). Die Einstülpungen vertiefen sich, bilden ein geschlossenes Bläschen und trennen sich vom Oolemma. Dabei legt sich die eingeschlossene Peroxidase in der Form eines Ringes eng an die Innenseite der Vesikelmembran (Abb. 50).

Die Membranaußenseite weist während der kurzen Zeitspanne des Ablösungsvorganges den schon vorher beschriebenen «coat» auf. Beim nachfolgenden Einwandern verlieren die Pinocytosebläschen den «coat», wobei zugleich das aufgenommene Material das Vesikellumen gleichmäßig ausfüllt (Abb. 51).

Die Vesikel beginnen in der Folge sehr rasch miteinander zu verschmelzen. 60 Min. nach der Injektion sind im gesamten peripheren Cytoplasma (Periplasma) Verschmelzungsprodukte mit einem Durchmesser von 2 μ zu erkennen (Abb. 52). Durch die fortlaufende Anlagerung von weiteren markierten Pinocytosebläschen entstehen nach 120 Min. runde Dotterschollen mit einem Durchmesser von ca. 4 μ (Abb. 53). Neben diesen durch die Fusion einzelner Vesikel selbständig aufgebauten Proteindotteranteilen, lagern sich einzelne mit dem Reak-

---

Abb. 41–44: Stadium A.

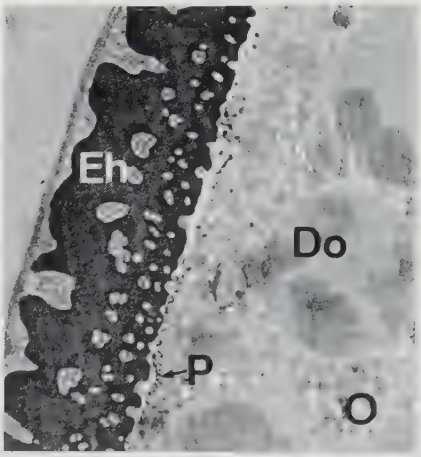
Abb. 41. Eindringen der Peroxidase (P) in die Basallamina (Bl). Mv = Microvilli, O = Ooplasma; Vergr. 66 300fach.

Abb. 42, 43. Das Reaktionsprodukt der Peroxidase ist in der Basallamina (Bl) und an den Membranen der Microvilli (Mv) nachweisbar. O = Ooplasma; Vergr. 51 900fach, 55 300fach.

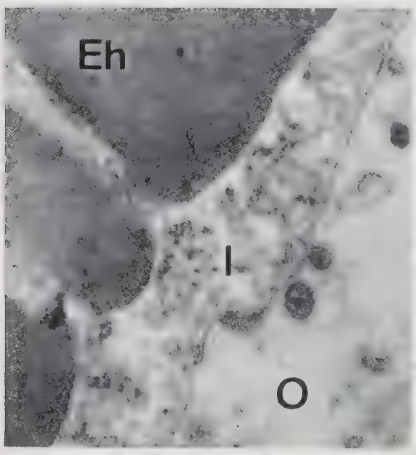
Abb. 44. Primär auftretende Segmente der Eihülle (Eh) werden durch die Peroxidase dunkel markiert. Bl = Basallamina, Mi = Mitochondrium; Vergr. 18 000fach.

Abb. 45. Stadium B: Die «coated vesicles» (cv) sind durch die Peroxidase markiert. Mv = Microvilli; Vergr. 55 300fach.

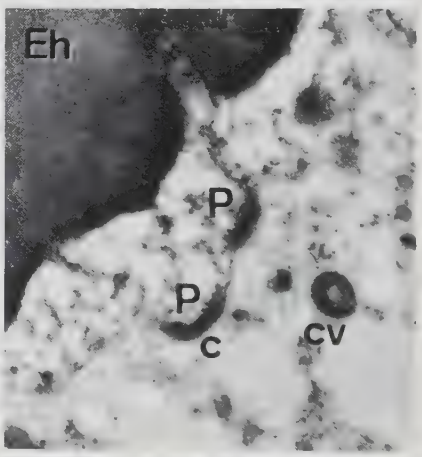
46



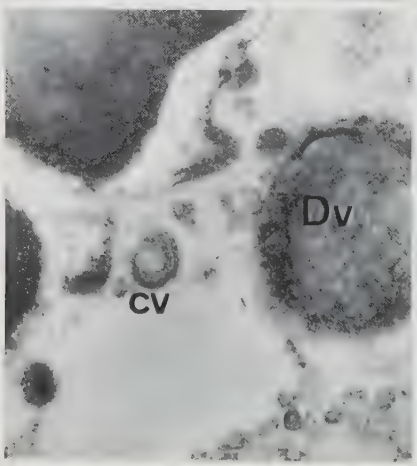
47



48



49



50

51

tionsprodukt der Peroxidase beladene Bläschen an die im Periplasma vorhandenen Proteindotterkugeln (Abb. 54).

Der Inkubationsversuch mit Peroxidase zeigt neben der Eihüllenmarkierung außerdem noch besonders deutlich, daß bei der ersten Traceraufnahme nach 10 Min. sämtliche Vesikel, die noch mit dem Oolemma in Verbindung stehen, den Tracer enthalten und somit Pinocytosebläschen darstellen. Eine Exocytose kann deshalb ausgeschlossen werden.

Alle Micropinocytosevesikel zeigen denselben Durchmesser. Sie verschmelzen entweder untereinander oder geben ihren Inhalt an größere Dotterschollen ab.

Im Gegensatz dazu fand ANDERSON (1969) durch Peroxidaseinjektion zwei verschiedene Vesikeltypen in den Ovocyten von *Periplaneta americana*. Wobei in diesen Ovocyten bereits während der Prävitellogenese auftretende kleinere Micropinocytosebläschen nach der Fusion zu tubulären Elementen mit Lysosomen verschmelzen. Ein zweiter größerer Bläschentypus tritt neben dem ersten während der Vitellogenese auf und erzeugt, wie in unserem Fall, ebenfalls als Verschmelzungsprodukt Dottervorstufen.

HECKER (mündliche Mitteilung) fand Dotterschollen mit einer positiven Reaktion nach saurer Phosphatasebehandlung im gesamten Cytoplasma. Aus den vorliegenden Resultaten kann jedoch nicht geschlossen werden, ob in den Ovocyten von *O. moubata* ein Teil der Pinocytosebläschen nutritives Material enthalten, welches diesen lysosomalen Formen zugeführt wird.

Interessant ist die ultrastrukturell erfaßbare Membrandynamik während des Micropinocytosevorganges. Die vom «coat» cytoplasmaseitig besetzten Membranstellen des Oolemmas kennzeichnen die Abschnitte, wo anschließend die Micropinocytosevesikel gebildet werden.

Abb. 46–54: Stadium B.

Abb. 46. 5 min nach der Injektion der Peroxidase sind die ersten Pinocytosevesikel (Pn) markiert. Die Eihülle (Eh) ist zu dieser Zeit noch nicht markiert. Mv = Microvilli, O = Ooplasma; Vergr. 34,600fach.

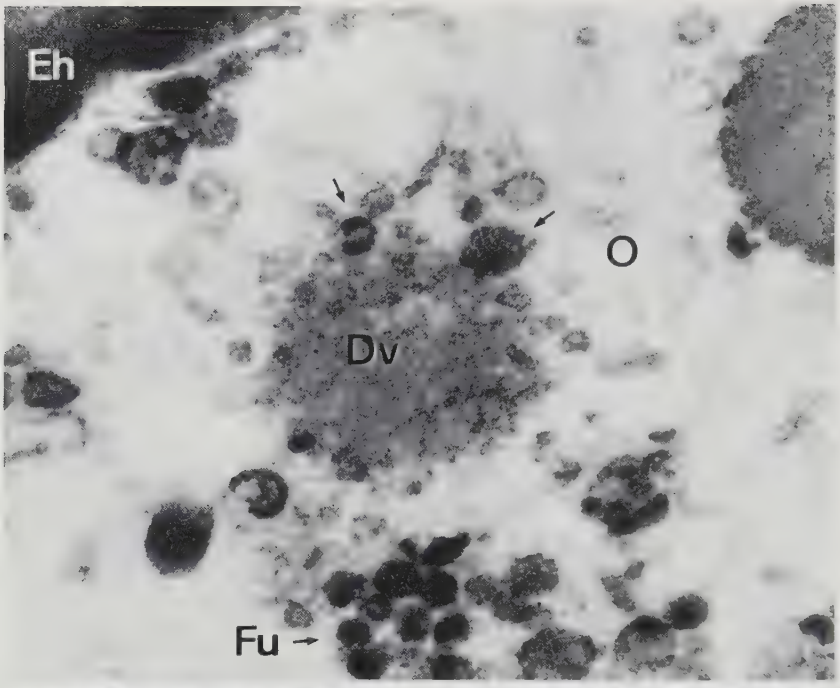
Abb. 47. Übersicht 15 min nach der Peroxidaseinjektion. Markierung der Eihülle (Eh) und der Pinocytoseregion (→P). Do = Dotterkugeln, O = Ooplasma; Vergr. 4500fach.

Abb. 48. Gleichmäßige Ausfüllung der Zone I durch das Reaktionsprodukt der Peroxidase. Eh = Eihülle, O = Ooplasma. Vergr. 36 000fach.

Abb. 49. Konzentrierung der Peroxidase (P) an gewissen Stellen der Oolemmaaußenseite. An der Oolemmainnenseite dieser Abschnitte ist ein «coat» (c) vorhanden. Eh = Eihülle, cv = «coated vesicles»; Vergr. 36 000fach.

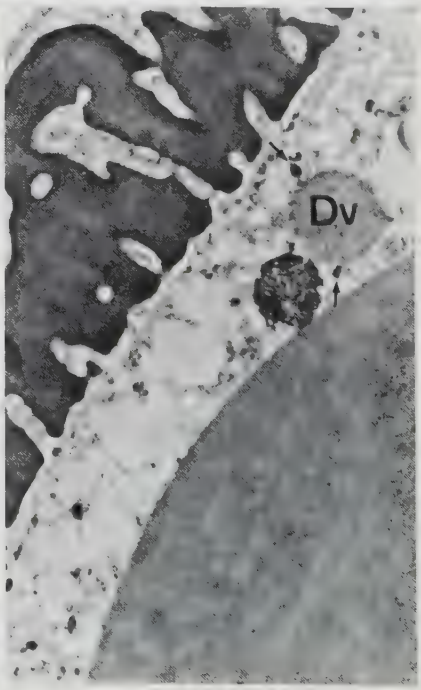
Abb. 50. Das eingeschlossene Material der «coated vesicles» (cv) bildet einen der Vesikelmembran innen anliegenden Ring. Dv = Dottervorstufe; Vergr. 36 000fach.

Abb. 51. Die Pinocytosebläschen (cv) verlieren während ihres Einwanderns (→) ins Periplasma ihren «coat». Dabei wird das Vesikel-Innere vom aufgenommenen Material gleichmäßig ausgefüllt; Vergr. 36 000fach.



52

53



54

Brandt (1962) ordnet diesem «coat» die Möglichkeit zu, die Moleküle des in der Folge aufgenommenen Materials selektiv auszuwählen und an das Oolemma zu binden (siehe auch Bennett 1963; Fawcett 1964 und Slautterback 1967).

Die Ovocyten von *O. moubata* scheinen hochspezialisierte Zellen darzustellen, die während der Vitellogenese mit Hilfe der Pinocytosevorgänge gezielt Stoffe aus der Hämolymphe auszuwählen und aufzunehmen vermögen (Anderson 1969; Brandt 1962). Die zwei von Diehl (1969, 1970) zu Beginn der Vitellogenese in der Hämolymphe und anschließend im reifen Ei gefundenen «female proteins» stellen den Hauptanteil der Eiproteine dar. Sie werden wohl durch diesen «coat» selektiv aus der Hämolymphe aufgenommen.

Die durch Micropinocytose gebildeten peripheren Proteindotterschollen haben nach 240 Min. ihre maximale Größe erreicht. Die injizierte Menge Peroxidase steht der Ovocyte zu dem Zeitpunkt nicht mehr zur Verfügung, denn nach 6 Std. erscheinen wieder unmarkierte Pinocytosebläschen.

C. Polysaccharidarstellung an Ultradünnschnitten

Neben der Abklärung der Synthese und den Transportvorgängen von Proteinen in der Ovocyte sollen die von Diehl (1970) histochemisch untersuchten Kohlehydratanteile des Dotters ultrastrukturell nachgewiesen werden (Abb. 55).

Mit den Darstellungsmethoden von Thiery (1967) ist es möglich, die im Gewebe vorhandenen Polysaccharide durch Schwermetallreaktionen im EM sichtbar zu machen.

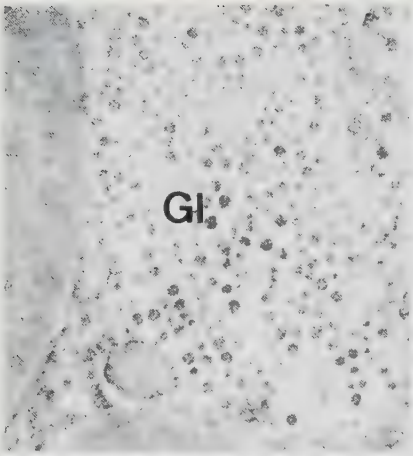
Die vorliegenden Resultate erhielten wir mittels der PA-TCH-Albumosesilbermethode: Nach Thiery (1967) wird während der Oxidation durch PA das Osmium aus den Schnitten entfernt. Weiter werden die 1–2-Glykolbindungen der Polysaccharide geöffnet und durch Aldehydgruppen ersetzt. Die Aldehydgruppen verbinden sich danach mit den Thiogruppen des TCH, welche anschließend mit dem Silber des verwendeten Silbersalzes reagieren und dadurch im EM sichtbar werden. Durch das verschieden lange Flottieren auf TCH können einfache Kohle-

---

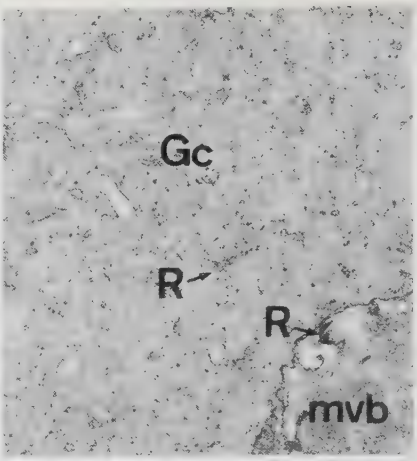
Abb. 52. Fusion (→Fu) der Pinocytosevesikel zu Dottervorstufen (Dv). Eh = Eihülle, O = Ooplasma; Vergr. 36 000fach.

Abb. 53. 120 min nach der Peroxidaseinjektion sind im gesamten Periplasma Dottervorstufen (Dv) mit peroxidasenaktivem Inhalt entstanden. Eh = Eihülle, O = Ooplasma; Vergr. 15 000fach.

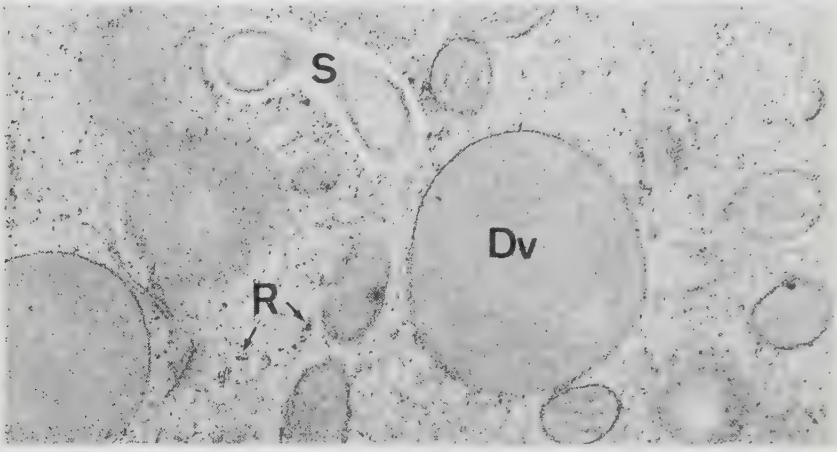
Abb. 54. Anlagerung (→) von Pinocytosebläschen mit dem Reaktionsprodukt der Peroxidase an bereits vor dem Inkubationsversuch gebildete unmarkierte Dottervorstufen (Dv); Vergr. 12 000fach.



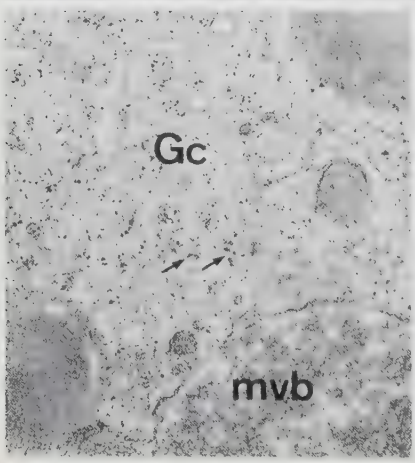
55



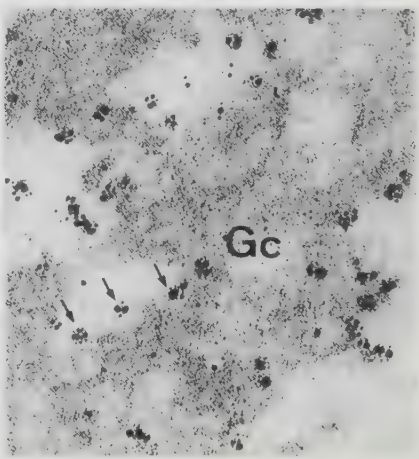
56



57



58



59

hydrate und komplexere Polysaccharidverbindungen zeitlich differenziert dargestellt werden.

Die durchgeführten Kontrollversuche zeigten keine Argentaffinität des Ovocytengewebes, so daß die positiven Reaktionen der zum Teil modifizierten Nachweisreaktionen als spezifisch angesehen werden dürfen.

Die Ovocyten im Stadium A sind nach einstündigem Flottieren auf TCH schwach positiv. Die Reaktion läßt sich im Retikuloplasma und in den «multivesiculate bodies» feststellen (Abb. 56). Nach längerem Flottieren auf TCH verstärkt sich die Silbereinlagerung nicht. Daraus kann geschlossen werden, daß die vorhandenen Polysaccharide in Form von reinem Glykogen vorliegen. Eine Verbindung der vorhandenen Proteine mit dem Glykogen in den Proteindotteranteilen läßt sich in diesem Stadium noch nicht feststellen.

Interessant sind die Verteilungs- und Formunterschiede der Polysaccharide im Stadium B: zu Beginn dieses Stadiums ist nach einstündigem Flottieren der Schnitte auf TCH eine feine Silberreaktion im gesamten Retikuloplasma zu beobachten (Abb. 57).

Die Reaktionsmethode läßt deutlich die Form der Polysaccharide erkennen (Abb. 58). Es handelt sich wohl um β-Glykogen, da nach dieser kurzen TCH-Behandlung nur reine Polysaccharide markiert werden und einfache Mono- und Disaccharide durch die angewandte Fixierungsmethode aus dem Gewebe entfernt worden sind (Neutra & Leblond 1966). Die β-Glykogenkörper sind aus 3–4 Partikeln zusammengesetzt, die eine Größe von 30–40 Å aufweisen (Abb. 59). Wahrscheinlich handelt es sich dabei um die von Drochmanns (1962) beschriebenen γ-Glykogenpartikeln.

Eine Verbindung des Glykogens mit irgendeinem Zellkompartiment ist nicht feststellbar. Die β-Glykogenpartikel liegen frei im Cytoplasma. Ihre Synthese findet wahrscheinlich überall im Grundcytoplasma mittels Glykogensynthetase statt (Engels & Bier 1964).

Eigenartig ist die granuläre Markierung der Grana mitochondriales (Abb. 63). Weiter zeigen die Peripherien der Lipidtropfen eine ähnlich

---

Abb. 55. Kohlehydratanteil des Dotters am Ende der Vitellogenese in Form von α-Glykogenrosetten (Gl); Vergr. 15 000fach.

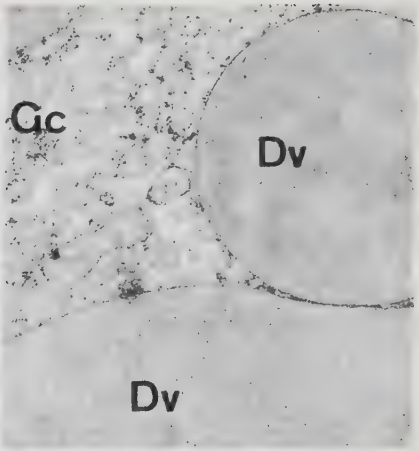
Abb. 56. Stadium A: Nach einstündiger TCH-Behandlung ist eine Silberreaktion (→R) im Grundcytoplasma (Gc) und in den "multivesiculate bodies" (mvb) festzustellen; Vergr. 24 000fach.

Abb. 57–70: Stadium B.

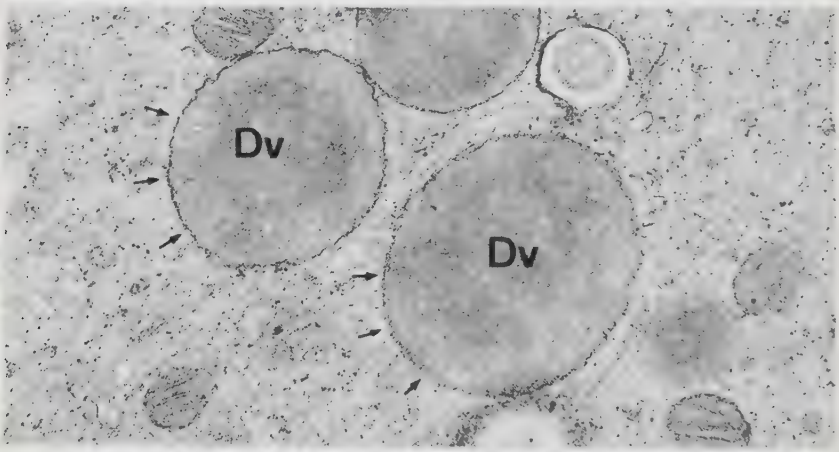
Abb. 57. Nach einstündigem Flottieren auf TCH ist eine Silberreaktion (→R) im Grundcytoplasma vorhanden. Dv = Dottervorstufen, S = Symbiont; Vergr. 24 000fach.

Abb. 58, 59. Markiertes β-Glykogen (→) im Grundcytoplasma (Gc), mvb = "multivesiculate bodies". Das β-Glykogen ist aus einzelnen γ-Glykogenpartikeln zusammengesetzt. Vergr. 24 000fach, 72 000fach.

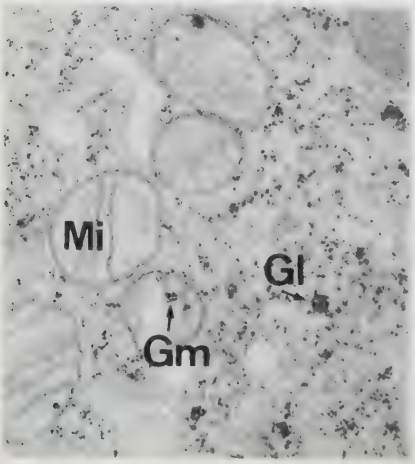
60



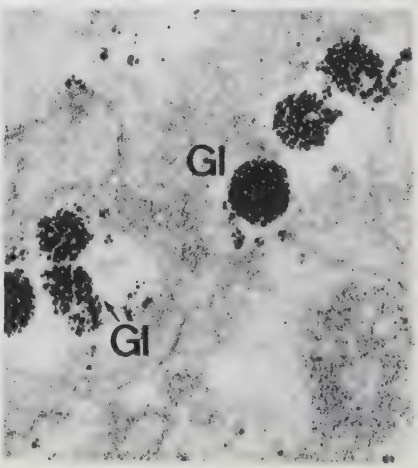
61



62



63



64

feine Silbergranulierung, wie sie THIERY (1967) in den Zellen der embryonalen Rattenleber fand (Abb. 60).

Nach 48stündiger TCH-Behandlung ist neben der Reaktion im Grundcytoplasma ebenfalls eine Silbermarkierung in den Proteindotterschollen zu beobachten (Abb. 61). Da diese Markierung erst nach einer relativ langen TCH-Behandlung auftritt, kann angenommen werden, daß es sich dabei um komplexe Polysaccharidverbindungen (Hämoglyko-lipoproteine nach DIEHL 1970) handelt.

Die Frage nach dem Ort der Koppelung von Kohlehydrat- und Proteinanteil kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Die Vesikel, die aus den Golgi-Zonen und eventuell direkt vom ER zu den Proteindotterschollen gelangen, sind nicht markiert. Hingegen sind die Membranen dieser Dotterkugeln oft stark durch Silbereinlagerungen hervorgehoben (Abb. 62). Es könnte sein, daß die Koppelung von Protein- und Kohlenhydratkomponenten erst dort stattfindet.

Gegen das Ende des Stadiums B legen sich vorerst nur im zentralen Ooplasmabereich einzelne β-Glykogengranula zusammen und bilden die α-Glykogenrosetten (Abb. 63, 64, 65). Diese Glykogenform stellt neben den Proteindotterschollen und den Lipidtropfen die dritte Dot-

---

Abb. 60. Silberreaktion (→) über dem peripheren Bereich der Lipidtropfen (L). Dv = Dottervorstufen; Vergr. 18 000fach.

Abb. 61. 48stündige TCH-Behandlung: Silberreaktion in den Dottervorstufen (Dv) und im Grundcytoplasma (Gc); Vergr. 18 000fach.

Abb. 62. Starke Silberreaktion (→) in den Membranen der Dottervorstufen (Dv) nach 12stündiger TCH-Behandlung; Vergr. 24 000fach.

Abb. 63, 64. Bildung der α-Glykogenrosetten (→Gl) gegen das Ende des Stadiums B. Granuläre Darstellung der Grana mitochondriales (→Gm) durch die histochemische Behandlung; Mi = Mitochondrien; Vergr. 24 000fach, 54 000fach.

Abb. 65. Spätes Stadium B: Einstündige TCH-Behandlung. Silberreaktion in den α-Glykogenrosetten (Gl). Do = Dotterkugeln, Dv = Dottervorstufen, L = Lipidtropfen; Vergr. 18 000fach.

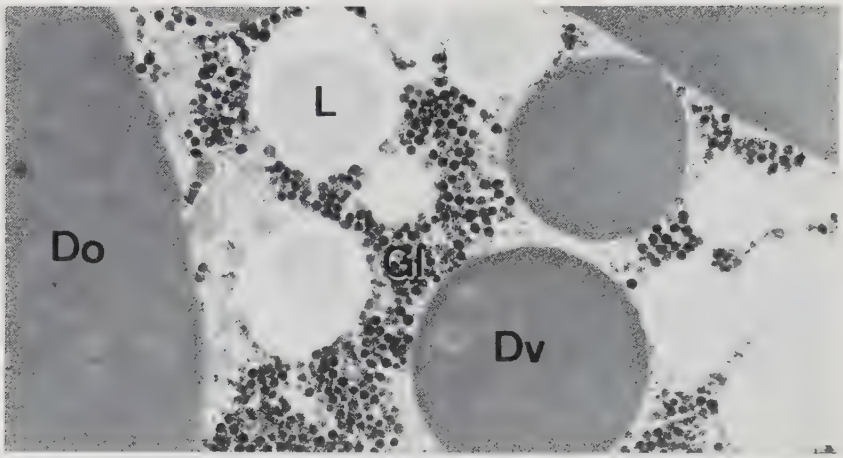
Abb. 66. Spätes Studium B: 48stündige TCH-Behandlung. Neben der Reaktion in den Glykogenrosetten (Gl) ist eine Silberreaktion in den Proteindotteranteilen (Do, Dv) zu erkennen. L = Lipidtropfen; Vergr. 18 00fach.

Abb. 67. Durch die α-Amylasebehandlung werden die α-Glykogenrosetten (Gl) weitgehend aus den Schnitten herausgelöst. Die Dotterproteinanteile (Do) sind amylaseresistent. Mi = Mitochondrien; Vergr. 24 000fach.

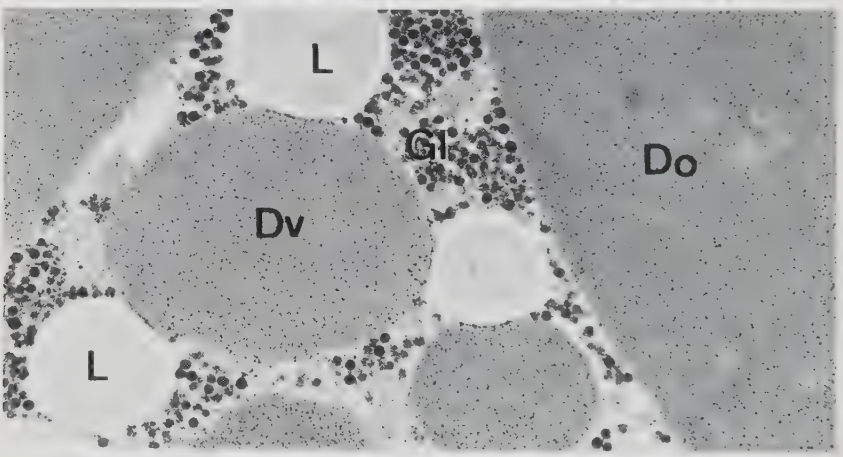
Abb. 68. Nach der Behandlung mit PA und nachfolgender Nachkontrastion erscheinen die Glykogenrosetten (Gl) fein granulär. Do = Dotterkugel, L = Lipidtropfen; Vergr. 27 000fach.

Abb. 69. Einstündige Behandlung mit TCH: Die Eihülle (Eh) und die Pinocytoseregion (Pr) ist unmarkiert. Im Grundcytoplasma zeigen die α- und β-Glykogenanteile eine Silberreaktion. A = Annulate lamellae, Dv = Dottervorstufe, G = Golgi-Feld, Mi = Mitochondrium, Mv = Microvilli; Vergr. 18 000fach.

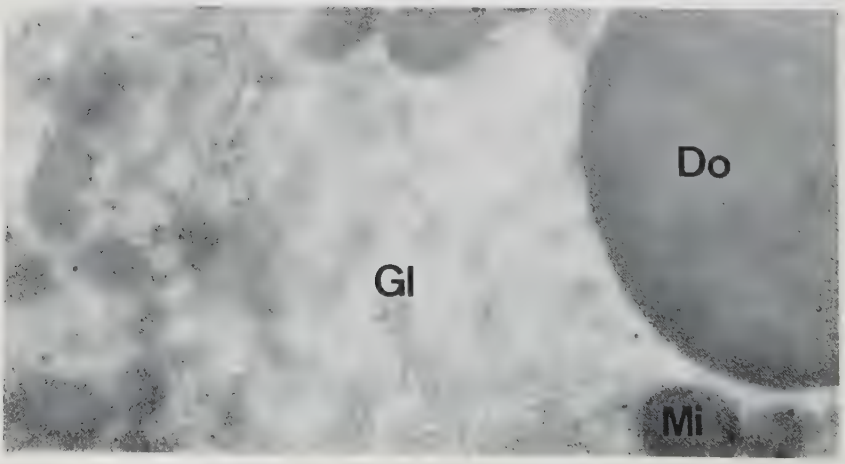
Abb. 70. 48stündige TCH-Behandlung: Während die Eihülle (Eh) und die Pinocytoseregion (Pr) unmarkiert sind, ist eine feine Silberreaktion im peripheren Grundcytoplasma (Gc) und in den Proteindotteranteilen (Do, Dv) zu erkennen. Mv = Microvilli; Vergr. 20 000fach.



65

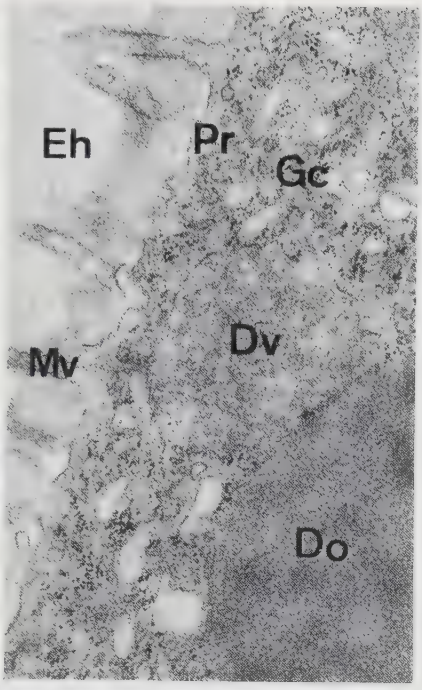


66

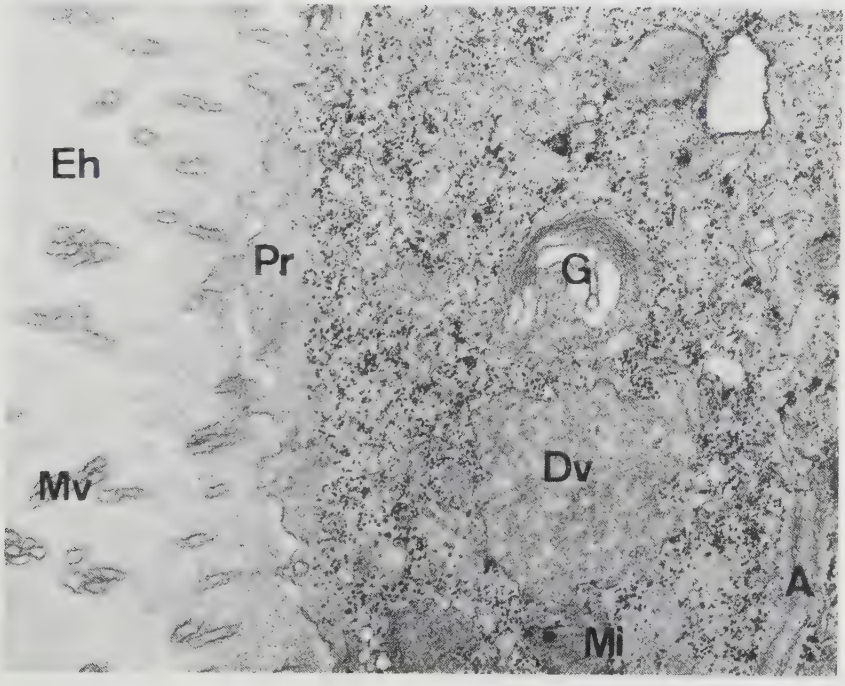


67

68



70



69

terkomponente dar. Die Bildung des α-Glykogens läßt sich vom Ovocytenzentrum nach außen hin verfolgen. Zuletzt erscheinen auch im peripheren Ooplasma die eben erwähnten Glykogenformen. Nun sind praktisch keine β-Glykogengranula mehr vorhanden. Nach 48stündiger TCH-Behandlung liegt das Depot der feinen Silbermarkierung nur noch in den α-Glykogenrosetten und den Proteindotterkugeln (Abb. 66).

Nach α-Amylasebehandlung werden die Glykogenrosetten fast gänzlich aus den Schnitten herausgelöst, währenddem die Dotterkugeln amylaseresistent sind (Abb. 67).

Die von LONGO & ANDERSON (1970) aufgeführte Methode zeigte ebenfalls eine positive Reaktion (Abb. 68).

In keiner Ovocytenform ist eine Reaktion in der Eihülle oder in den Micropinocytosebläschen zu beobachten (Abb. 69, 70). Eine Aufnahme von Glykogen oder komplexen Polysacchariden aus der Hämolymphe, wie sie FAVARD-SERENO (1969) in Grillenovocyten fand, kann in den Ovocyten von *O. moubata* ausgeschlossen werden. Es ist anzunehmen, daß diese Ovocyten wie diejenigen von Insekten (ENGELS & BIER 1967; ENGELS & DRESCHER 1964) Glucose aus der Hämolymphe aufnehmen und durch cytoplasmatische Glykogensynthetase das Glykogen aufbauen.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß die eigentliche Speicherform des reinen Kohlehydratdotters in der Ovocyte, die α-Glykogenrosetten, erst spät aufgebaut werden. Nämlich erst dann, wenn die endogene Proteinsynthese infolge der Reduktion des ER und der Golgi-Zonen zu Ende geht. Das zuerst auftretende β-Glykogen wird zum größten Teil an Proteine gebunden und als Glykoproteinanteil des Proteindotters verwendet.

V. Zusammenfassende Diskussion

Die während der Vitellogenese in der Ovocyte von *O. moubata* eingelagerten Proteindottersubstanzen stammen aus zwei verschiedenen Quellen. Der Einbau des 3H-Leucins im Stadium A zeigt deutlich, daß zu Beginn der Vitellogenese die primären Proteindotterschollen endogen synthetisiert werden. Diese autoradiographischen Ergebnisse unterstützen die Resultate von AESCHLIMANN & HECKER (1967, 1969).

Im nachfolgenden Stadium B erfolgt eine Stoffaufnahme aus der Hämolymphe durch Micropinocytosevorgänge. Dadurch wird die endogene Synthese des Proteindotters von der exogenen Synthese ergänzt, überdeckt und abgelöst, wie die Inkubation der Ovocyten in 60 Min. alter «heißer» Hämolymphe deutlich zeigen. Dabei bleiben die aufgenommenen Proteine durch das Verschmelzen der Micropinocytose-

vesikel als Dotterkugeln an der Ovocytenperipherie liegen und gelangen nicht ins zentrale Ooplasma.

Die zelleigene Synthesekapazität der Ovocyte für Proteine ist gegen das Ende der Vitellogenese stark vermindert. Das zeigt sich darin, daß der Einbau des 3H-Leucins nach Kurzzeitinkubation in ausgesuchten Spätstadien unerheblich war. Durch die Fähigkeit der Eizelle, vorgebildete Makromoleküle mittels Micropinocytose aus der Hämolymphe aufzunehmen, ist es ihr erst möglich, den reichen Dottergehalt aufzubauen. Die Ergebnisse der Inkubationsversuche mit Peroxidase und Ferritin zeigen dies deutlich.

Durch diese Resultate wird die Hypothese der exogenen Dotterquelle von Aeschlimann & Hecker (1967, 1969) bestätigt. Auch die von Diehl (1969, 1970) durch elektrophoretische und immunologische Methoden am selben Objekt erzielten Resultate stimmen gut mit unseren Ergebnissen überein. Es scheint, daß es sich bei den durch Micropinocytose aufgenommenen Proteinen in erster Linie um die zwei von ihm gefundenen «female proteins» handelt.

Die Selektionsfunktion des «coats» auf der Ooplasmaseite des Oolemmas scheint während der Stoffaufnahme durch Pinocytose eine wichtige Rolle zu spielen.

Der von Diehl (1970) durchgeführte Inkubationsversuch mit Trypanblau zeigte durch lichtoptische Auswertung des Experimentes, daß der Farbstoff von der Ovocyte während der Vitellogenese ebenfalls aufgenommen wird. Anscheinend war diese Aufnahme auch nur mit Hilfe von Pinocytosebläschen möglich. Im Unterschied zu unseren Inkubationsversuchen mit höhermolekularen Stoffen dringt das Trypanblau ins gesamte Peri- und Retikuloplasma ein, wobei auch einzelne Dotterschollen gefärbt werden. Das Ausbleiben einer deutlichen Färbung aller peripheren Dotterschollen und deren Vorstufen nach längeren Inkubationszeiten dürfte eventuell auf eine zellschädigende Wirkung des Farbstoffes zurückzuführen sein (Anderson & Telfer 1970; Stockinger 1964).

Die genauen quantitativen Anteile der beiden Proteindotterquellen müßten unter Einbeziehung der Morphometrie abgeklärt werden. Sicher ist, daß die endogene Synthese zu Beginn der Vitellogenese für den Proteindotteraufbau verantwortlich ist. Dabei werden im gesamten Ooplasma Dottervorstufen bis zu einem Durchmesser von 4 μ gebildet. Durch die Pinocytosevorgänge im Stadium B gelangen beträchtliche Mengen von Hämolymphproteinen in die Ovocyte und bestreiten den exogenen Anteil des Proteindotters. Sie stellen jedenfalls gegen das Ende der Vitellogenese die dominierende Proteindotterquelle dar.

Die Eihülle von *O. moubata* wird durch Proteineinlagerung aus der Hämolymphe und die nachfolgende Polimerisation dieser Stoffe gebildet. Wie die Inkubationsversuche gezeigt haben, ist ihre substantielle

Bildung nicht eine Leistung der Ovocyte. Hingegen ist es möglich, daß die Eizelle mit Hilfe der Microvilli den Aufbau steuert.

Die Synthese der Hämolymphproteine geschieht vor allem in den Zellen des Darmepithels. Damit hat sich diese Vermutung von DIEHL (1970) bestätigt.

Der Eikern ist während der Vitellogenese metabolisch sehr aktiv. Im Nucleolus gebildete Körper, die sich durch den Einbau der tritiierten Aminosäure auszeichnen, werden ins Ooplasma abgegeben. Neben dieser Synthese von Nucleoproteinen produziert er wahrscheinlich ebenfalls stabile, inaktivierte r-RNS und m-RNS, die dann während der Embryogenese wirksam werden (BRACHET et al. 1964; BRACHET 1967; DUPSIVA 1969; GROSS & COUSINEAU 1964; HANSEN-DELKESKAMP 1969). Die Inaktivierung dieser RNS kann durch die Anlagerung von spezifischen Proteinen geschehen (PETZELT & BIER 1970a). Nur die Untersuchung der DNS- und RNS-Synthese könnte hier nähere Aufschlüsse bringen, z. B. wären Versuche zur Abklärung der DNS-abhängigen RNS-Synthese durch Actinomycineinwirkung (REICH & GOLDBERG 1964) und der damit zusammenhängenden Proteinbildung interessant. Verschiedene Autoren beschreiben die zum Teil gegensätzlichen Einflüsse des Antibiotikum (PETZELT & BIER 1970a, 1970b; PASTAN & FRIEDEMANN 1968) auf die Transport- und Synthesevorgänge von Proteinen.

Das von ENGELS & BIER (1967) beschriebene antagonistische Verhältnis von Protein- und Glykogensynthese während der Oogenese in den Ovocyten von *Musca domestica* scheint bei *O. moubata* nicht zuzutreffen. Hier setzt die Glykogensynthese noch während der frühen Proteinsynthese durch die Bildung von β-Glykogen ein. Diese Glykogenformen stehen zusammen mit den Proteinen dem Aufbau des Glykoproteindotters zur Verfügung. Die Speicherform des reinen Glykogens, die α-Glykogenrosetten, erscheinen erst sehr spät am Ende der Vitellogenese im Reticuloplasma. RAMAMURTY (1968) beschreibt ähnliche Resultate bei *Panorpa communis*. Die Glykogensynthese muß im Reticuloplasma stattfinden, da eine Aufnahme von Polysacchariden durch Micropinocytose nicht festzustellen ist. Inkubationsversuche mit radioaktiver Glucose könnten hier genaue Aufschlüsse bringen.

Die Herkunft der dritten Dotterkomponente, der Lipide, kann nach den bis jetzt vorliegenden Ergebnissen nicht abgeklärt werden. Nach DIEHL (1970) könnten die Lipide an spezifische Hämolymphproteine gebunden in die Ovocyten gelangen. Bei Insekten ist bekannt, daß Hämolymphproteine Lipide transportieren (CHINO & GILBERT 1965; CHINO et al. 1969; MAYER & CANDY 1967; THOMAS & GILBERT 1967; THOMAS & LAWRENCE 1968; TOBE & LOUGHTON 1970; WANG & PATTON 1969).

Weitere ultrastrukturelle Arbeiten über den Bau und die Funktion

der Darmzellen (GRANDJEAN in Vorbereitung) sowie der praktisch noch unbekannten Rolle der Hämocyten können wichtige Aufschlüsse in bezug auf den Proteinmetabolismus dieser Zellen bringen. Somit würden auch die der Vitellogenese vorangehenden Fragen nach der Synthese und dem Transport der Proteine geklärt werden.

VI. Literaturverzeichnis

AESCHLIMANN, A. (1958). Développement embryonnaire d'*Ornithodorus moubata* (Murray) et transmission transovarienne de *Borrelia duttoni*. – Acta trop. *15*, 15–64.

AESCHLIMANN, A. (1968). La ponte chez *Ornithodorus moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). – Rev. suisse Zool. *75*, 1003–1039.

AESCHLIMANN, A. & HECKER, H. (1967). Observations préliminaires sur l'ultrastructure de l'ovocyte en développement chez *Ornithodorus moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). – Acta trop. *24*, 225–243.

AESCHLIMANN, A. & HECKER, H. (1969). Vitellogénèse et formation cuticulaire chez l'œuf d'*Ornithodorus moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). Etude au microscope éléctronique. – Acarologia, *XI*, 180–192.

AESCHLIMANN, A. & HECKER, H. (1970). Présence de membranes annélées dans les ovocytes d'*Ornithodorus moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). – Acta trop. *27*, 268–270.

AGGARWAL, S. K. (1968). Pinocytosis during vitellogenesis in the mealworm *Tenebrio molitor* L. – Acta ent. bohemoslov. *65*, 272–275.

ALLFREY, V. G. (1963). Nuclear ribosomes, messenger RNA and protein synthesis. – Expl. Cell Res. Suppl. *9*, 183–212.

ANDERSON, E. (1964). Oocyte differentiation and vitellogenesis in the roach *Periplaneta americana*. – J. Cell. Biol. *20*, 131–155.

ANDERSON, E. (1968). Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in the pipefish, *Syngnatus fuscus*, and the killfish *Fundulus heteroclitus*. – J. Morph. *126*, 163–198.

ANDERSON, E. (1969). Oogenesis in the cockroach, *Periplaneta americana*, with special reference to the specialization of the oolemma and the fate of coates vesicles. – J. Microscop. *8*, 721–738.

ANDERSON, E. & HUEBNER, E. (1968). Development of the oocyte and its accessory cells of the polychaete *Diopatra cuprea* (Bosc.). – J. Morph. *126*, 163–198.

ANDERSON, L. M. & TELFER, W. H. (1970). Trypan blue inhibition of yolk deposition-a clue to follicle cell function in the cecropia moth. – J. Embryol. exp. Morph. *23*, 35–52.

ARNDT, E. A. (1960). Die Aufgaben des Kerns während der Oogenese der Teleostier. – Z. Zellforsch. *51*, 356–378.

AUSTIN, C. R. (1961). The Mammalian Egg. – 183 pp. Oxford: Blackwell.

BABBAGE, P. C. & KING, P. E. (1970). Post-fertilization functions of annulate lamellae in the peripherie of the egg of *Spirorbis borealis* (Daudin), (Serpulidae-Annelida). – Z. Zellforsch. *107*, 15–22.

BALASHOV, Y. S. (1964). Structure and development of the genital system in ticks of the superfamily Ixodoidea. – Parazit. Sborn. Zool. Inst. Akad. Nauk SSSR *22*, 28–60.

BEAMS, H. W. & KESSEL, R. G. (1963). Electron microscope studies on developing crayfish oocytes with special reference to the origin of yolk. – J. Cell Biol. *18*, 621–649.

Beams, H. W. & Kessel, R. G. (1968). The Golgi apparatus, structure and function. – Int. Rev. Cytol. *23,* 209–276.

Beams, H. W. & Sekhon, S. S. (1966). Electron microscope studies on the oocyte of the fresh water mussel (Anadonta), with special reference to the stalk and mechanism of yolk deposition. – J. Morph. *119,* 477–501.

Bennett, H. S. (1963). Morphological aspects of extra cellular polysaccharides. – J. Histochem. Cytochem. *11,* 14–23.

Bergeron, M. & Droz, B. (1969). Protein renewal in mitochondria as revealed by electron microscope radioautography. – J. Ultrastr. Res. *26,* 17–30.

Bernhard, W. & Granboulan, N. (1968). The nucleolus in vertebrate cells; in: The nucleus, edited by A. J. Dalton & F. Haguenau. – 244 pp. New York and London: Academic Press.

Bier, K. (1963). Autoradiographische Untersuchungen über die Leistungen des Follikelepithels und den Nährzellen bei der Dotterbildung und Eiweißsynthese im Fliegenovar. – Wilhelm Roux' Arch. Entwickl. Mech. Org. *154,* 552–575.

Bier, K. (1968). Insect oogenesis with special reference to nuclear structure and function. – Accademia Nazionale dei Lincei quaderno N. 104, 61–72.

Bier, K. & Ramamurty, P. S. (1964). Elektronenoptische Untersuchungen zur Einlagerung der Dotterproteine in die Oocyte. – Naturwissenschaften *51,* 223–224.

Bodnaryk, R. P. & Morrison, P. E. (1966). The relationship between nutrition, hemolymph proteins and ovarian development in *Musca domestica.* – J. Insect Physiol. *12,* 963–976.

Brachet, J. (1967). Biochemical changes during fertilization and early embryonic development. In: Cell differentiation (Renck & Knight, ed.). – London: Churchill Ltd.

Brachet, J., Denis, H. & Vitry, F. de. (1964). The effects of actinomycin D and puromycin on morphogenesis in amphibian eggs and *Acetabularia mediterranea.* – Develop. Biol. *9,* 398–412.

Brandt, P. W. (1962). A consideration of the extraneous coats of the plasma membrane. – Circulation *26,* 1075–1091.

Buchner, P. (1965). Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. – 909 pp. New York, London: Interscience Publishers.

Burgdorfer, W. (1951). Analyse des Infektionsverlaufes bei *Ornithodorus moubata* (Murray) und der natürlichen Übertragung von *Spirochaeta duttoni.* – Acta trop. *8,* 193–262.

Caro, L. C. (1961). Electron microscopic radioautography of thin sections: The Golgi zone as a site of protein concentration in pancreatic acinar cells. – J. biophys. biochem. Cytol. *10,* 37–45.

Caro, L. C. & van Tubergen, R. P. (1962). High resolution autoradiography. I. Methods. – J. Cell Biol. *15,* 173.

Chino, H. & Gilbert, L. I. (1965). Lipid release and transport in insects. – Biochim. Biophys. Acta *98,* 94–110.

Chino, H., Saturo, M. & Keiji, H. (1969). Diclyceride carrying lipoproteins in insect hemolymph. Isolation, purification and properties. – Biochim. Biophys. Acta *176,* 1–26.

Cohn, R. H. & Brown, E. H. (1968). The formation of alpha (proteoid) yolk spheres in the oocyte of *Drosophila melanogaster.* – Dros. Info Serv. *43,* 117.

Coles, G. C. (1965). Haemolymph proteins and yolk formation in *Rhodnius prolixus* Stal. – J. exp. Biol. *43,* 425–431.

Cummings, M. R. & King, R. C. (1970). The cytology of the vitellogenic stages of oogenesis in *Drosophila melanogaster.* II. Ultrastructural investigations on the origin of protein yolk spheres. – J. Morph. *130,* 467–478.

Danes, B. S. & Struthers, M. (1961). The influence of iron-dextran complex on the strain L. fibroblast. – J. biophys. biochem. Cytol. *10,* 289–292.

De Duve, C. (1963). The lysosome. – Sci. Amer. *208,* 64–72.

Dhainaut, A. (1968). Etude par autoradiographie à haute résolution de l'élaboration des mucopolysaccharides acides ou cours de l'ovogénèse de *Nereis pelagia* L. – J. Microscopie *7,* 1075–1080.

Diehl, P. A. (1969). Hämolymphproteine und Vitellogenese bei *Ornithodorus moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). – Bull. Soc. ent. suisse *42,* 117–125.

Diehl, P. A. (1970). Zur Oogenese bei *Ornithodorus moubata,* Murray (Ixodoidea, Argasidae) unter besonderer Berücksichtigung der Vitellogenese. – Acta trop. *27,* 301–355.

Drochmanns, P. (1962). Morphologie du glygogène. Etude au microscope électronique de colorations négatives du glycogène particulaire. – J. Ultrastructure Res. *6,* 141–163.

Droller, M. S. & Roth, T. F. (1966). An electron microscope study of yolk formation during oogenesis in *Lebistes reticulatus* Guppyi. – J. Cell Biol. *28,* 209–232.

Dumont, J. N. & Anderson, E. (1967). Vitellogenesis in the horseshoe crab *Limulus polyphemus.* – J. Microscopie *6,* 791–806.

Dupsiva, F. (1969). Molekularbiologische Aspekte der Entwicklungsphysiologie. – Naturw. Rdsch. *22,* 191–202.

Engelmann, F. (1969). Female specific protein: biosynthesis controlled by corpora allatum in *Leucophaea maderae.* – Science *165,* 407–409.

Engels, W. & Bier, K. (1967). Zur Glykogenspeicherung während der Oogenese und ihrer vorzeitigen Auslösung durch Bockierung der RNS-Versorgung (Untersuchung an *Musca domestica* L.). – Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. *158,* 64–88.

Engels, W. & Drescher, W. (1964). Einbau von 3H-D-Glucose während der Oogenese bei *Apis mellifica* L. – Experientia *20,* 445–446.

Esper, H. (1965). Studies on the nucleolar vacuole in the oogenesis of *Arbacia punctulata.* – Exptl. Cell Res. *38,* 85–96.

Farquhar, M. G. & Palade, G. E. (1962). Incorporation of electronopaque tracers by cells of the renal glomerulus. – 5th International Congress for Electron Microscopy, Philadelphia (S. S. Breese, Jr., ed.). 2, LL-3. New York: Academic Press, Inc.

Farrant, J. L. (1954). An elctron miscrocopic study of ferritin. – Biochim. Biophys. Acta *13,* 569–576.

Favard-Sereno, C. (1964). Phenomène de pinocytose au cours de la vitellogénèse protéique chez le grillon (Orthoptère). – J. Microscopie *3,* 323–338.

Favard-Sereno, C. (1969). Capture de polysaccharides par micropinocytose dans l'ovocyte du grillon en vitellogénèse. – J. Microscopie *8,* 401–414.

Fawcett, D. W. (1964). Local specializations of the plasmalemma in micropinocytosis vesicles of erythroplasts. – Anat. Rec. *148,* 370.

Fawcett, D. W. (1966). An atlas of fine structure: The cell. Its organelles and inclusions. – 2nd ed. Philadelphia: Saunders.

Friend, D. S. & Fahrquhar, M. G. (1967). Functions of coated vesicles during protein absorption in the rat vas deferens. – J. Cell Biol. *35,* 357–376.

Geigy, R. & Herbig, A. (1955). Erreger und Überträger tropischer Krankheiten. – Acta trop. Suppl. 6, 427 pp. – Basel: Verlag für Recht und Gesellschaft.

Geyer, G. (1969). Ultrahistochemie. – Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Graham, R. C., Jr. & Karnovsky, M. J. (1966). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. – J. Histochem. Cytochem. *14,* 291–302.

GRANDJEAN, O. (In Vorbereitung.)

GROSS, P. R. & COUSINEAU, G. H. (1964). Macromolecule synthesis and the influence of actinomycin on early development. – Exp. Cell Res. *33*, 368–395.

HANSEN-DELKESKAMP, E. (1969). Synthese von RNS und Protein während der Oogenese und der frühen Embryogenese von *Acheta domestica*. – Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. *162*, 114–120.

HAY, E. D. (1968). The nucleolus in developing cells. In: The nucleus, edited by DALTON, A. J. & HAGUENAU, F. – 244 pp. New York and London: Academic Press

HECKER, H. (1970a). Ultrastruktur der Ovocyten von *Ornithodorus moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae) nach Triple Fixation. – Experientia *26*, 877–880.

HECKER, H. (1970b). Ultrastruktur der Symbionten in Ovocyten von *Ornithodorus moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae) nach simultaner Glutaraldehyd-Osmiumfixierung und Nachbehandlung mit Uranylacetat (Triple-Fixation). – Experientia *26*, 874–877.

HECKER, H., AESCHLIMANN, A. & BURCKHARDT, M. J. (1968). Contribution à la connaissance des symbiotes chez *Ornithodorus moubata* (Ixodoidea). Etude au microscope électronique. – Acta trop. *25*, 256–261.

HECKER, H. & AESCHLIMANN, A. (1970). Ultrastrukturelle Aspekte der Eibildung bei *Rhipicephalus bursa* (Canestrini und Fanzago), (Ixodoidea, Ixodidae). – Z. Tropenmed. Parasit. *21*, 31–45.

HINSCH, G. W. & CONE, M. V. (1969). Ultrastructural observations of vitellogenesis in the spider crab, *Libinia emarginata* L. – J. Cell Biol. *40*, 336–342.

HOPKINS, C. R. & KING, P. E. (1966). An electron-microscopical and histochemical study of the oocyte periphery in *Bombus terrestris* during vitellogenesis. – J. Cell Sci. *1*, 201–216.

HULTIN, T. (1964). Ribosomal functions related to protein synthesis. – Intern. Rev. Cytol. *16*, 1–36.

KARNOVSKY, M. J. (1967). The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. – J. Cell Biol. *35*, 213–236.

KAY, G. I., DONN, A. & MALLETT, N. (1962). Studies on the cornea. II. The uptake and transport of colloidal particles by the living rabbit cornea *in vitro*. – J. Cell Biol. *12*, 481–501.

KESSEL, K. (1963). Autoradiographische Untersuchungen über die Leistungen des Follikelepithels und der Nährzellen bei der Dotterbildung und Eiweißsynthese im Fliegenovar. – Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. *154*, 552–575.

KESSEL, R. G. (1966a). An electron microscope study of nuclearcytoplasmic exchange in oocytes of *Ciona intestinalis*. – J. Ultrastruct. Res. *15*, 181–196.

KESSEL, R. G. (1966b). Some observations on the ultrastructure of the oocyte of *Thyone briareus* with special reference to the relationship of the Golgi complex and endoplasmic reticulum in the formation of yolk. – J. Ultrastruct. Res. *16*, 305–319.

KESSEL, R. G. (1967). An electron microscope study of the spermiogenesis in the grasshopper with particular reference to the development of micritubular systems during differentiation. – J. Ultrastruct. Res. *18*, 677–694.

KESSEL, R. G. (1968a). Mechanism of protein yolk synthesis and deposition in crustacean oocytes. – Z. Zellforsch. *89*, 17–38.

KESSEL, R. G. (1968b). Annulate lamellae. – J. Ultrastruct. Res. Suppl. *10*, 82 pp.

KESSEL, R. G. (1968c). An electron microscope study of differentiation and growth in oocytes of *Ophioderma panamensis*. – J. Ultrastruct. Res. *22*, 63–89.

KESSEL, R. G. (1968d). Electron microscope studies on developing oocytes of a coelenterate medusa with special reference to vitellogenesis. – J. Morph. *126*, 211–248.

Kessel, R. G. & Kemp, N. E. (1962). An electron microscope study on the oocyte, test cells and follicular envelope of the tunica *Molgula manhattensis*. – J. Ultrastruct. Res. *6*, 57–76.

King, R. C. & Aggarwal, S. K. (1965). Oogenesis in *Hyalophora cecropia*. – Growth *29*, 17–83.

King, P. E., Bailey, J. H. & Babbage, P. C. (1969). Vitellogenesis and formation of the egg chain in *Spirorbis borealis* (Serpulidae). – J. Mar. Biol. Ass. UK. *49*, 141–150.

King, P. E. & Richards, J. G. (1968). Accessory nuclei and annulate lamellae in hymenopteran oocytes. – Nature (Lond.) 488.

Korfsmeier, K. H. (1966). Zur Genese des Dottersystems in der Oocyte von *Brachydanio rerio*. – Z. Zellforsch. *71*, 283–296.

Laufer, H. (1960). Blood proteins in insect development. – Ann. N.Y. Acad. Sci. *89*, 490–515.

Leblond, C. P. & Amano, M. (1962). Synthetic activity in the nucleolus as compared to that in the rest of the cell. – J. Histochem. Cytochem. *10*, 162–174.

Locke, M. & Collins, J. V. (1968). Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. – J. Cell Biol. *36*, 453–484.

Longo, F. J. & Anderson, E. (1970). Structural and cytochemical features of the sperm of the cephalopod *Octopus bimaculatus*. – J. Ultrastruct. Res. *32*, 94–106.

Luescher, M., Moesch, K.; Scheurer, R. & Wyss-Huber, M. (1966). Hormonal control of protein synthesis in the fat body of *Leucophaea maderae*. – Int. Symp. Insect Endocr. Brno.

MacGregor, H. C. & Stebbings, H. (1970). A massive system of microtubules associated with cytoplasmic movement in teleotrophic ovarioles. – J. Cell Sci. *6*, 431–449.

Markus-Kopriwa, B. (1965). Demonstration of the coating technique for electron microscopic autoradiography. – Anat. Rec. *151*, 490.

Massover, W. H. (1968). Cytoplasmic cylinders in bullfrog oocytes. – J. Ultrastruct. Res. *22*, 159–167.

Maunsbach, A. B. (1963). Electron microscopic observations on ferritin absorption in microperfused renal proximal tubules. – J. Cell Biol. *19*, 48A.

Mayer, R. J. & Candy, D. J. (1967). Changes in haemolymph lipoproteins during locust flight. – Nature (Lond.) *215*, 987.

McIntosh, J. R. & Porter, K. R. (1967). Microtubules in spermatids of the domestic fowl. – J. Cell Biol. *35*, 153–174.

Melius, M. E. (1966). An autoradiographic analysis of blood uptake and protein yolk sphere formation by cecropia moth oocytes. – Ph.D. thesis, Univ. of Pennsylvania.

Meng, C. (1970). Autoradiographische Untersuchungen am Oosom in der Oocyte von *Pimpla turionella* L. (Hymenoptera). – Wilhelm Roux' Archiv *165*, 35–52.

Miller, O. L., Jr. (1962). Studies on the ultrastructure and metabolism of nucleoli in amphibian oocytes. – In "Electron Microscopy" (S. S. Breese, Jr., ed.). Vol. 2, pp. NN-8. New York: Academic Press.

Mollenhauer, H. H. & Whaley, W. G. (1963). An observation on the functioning of the Golgi apparatus. – J. Cell Biol. *17*, 222–225.

Morill, J. B., Perkins, F. O. & Nasti, J. C. (1967). Ultrastructure of the cortical region of the egg of *Limnea palustris* with particular reference to the occurrence of microtubules. – Amer. Zool. *7*, 754.

Moses, M. J. (1964). Application of autoradiography to electron microscopy. – J. Histochem. *12*, 115–130.

Neutra, M. & Leblond, C. P. (1966). Radioautographic comparison of the uptake

of galactose-3H and glucose-3H in the Golgi region of various cells secreting glycoproteins or mucopolysaccharides. – J. Cell Biol. *30,* 137–150.

Pan, M. L., Bell, W. J. & Telfer, W. H. (1969). Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. – Science *165,* 393–394.

Pappas, G. D. & Tennyson, V. M. (1962). An electron microscopic study of the passage of colloidal particles from the blood vessels of the ciliary processes and choroid plexus of the rabbit. – J. Cell Biol. *15,* 227–239.

Pastan, I. & Friedmann, R. (1968). Actinomycin D: Inhibition of phospholipid synthesis in chick embryo cells. – Science *160,* 316–317.

Peters, T. & Ashley, C. A. (1967). An artefact in autoradiography due to binding of free amino acids to tissues by fixatives. – J. Cell Biol. *33,* 53–60.

Petzelt, Ch. & Bier, K. (1970a). Hemmung und Induktion von Proteinsynthesen durch Actinomycin in den wachsenden Oocyten von *Musca domestica.* – Wilhelm Roux' Arch. *164,* 341–358.

Petzelt, Ch. & Bier, K. (1970b). Synthese der Hämolymphproteine und die Aufnahme der Dotterfraktion in die Oocyte unter Actinomycin-Einfluß (Untersuchungen an *Musca domestica*). – Wilhelm Roux' Arch. *164,* 359–366.

Porter, K. R. (1966). Cytoplasmic microtubulus and their functions. In: Principles of Biomolecular Organization (ed. G. E. W. Wolstenholme & M. O'Connor), pp. 308–356. – London: Churchill.

Prescott, D. M. (1962). Nucleic acid and protein metabolism in the macronuclei of two ciliated protozoa. – J. Histochem. Cytochem. *10,* 145–153.

Ramamurty, P. S. (1968). Origin and distribution of glycogen during vitellogenesis of the scorpion fly, *Panorpa communis.* – J. Insect Physiol. *14,* 1325–1330.

Ramamurty, P. S. & Majumdar, U. (1967). Heterosynthetic origin of protein yolk in *Delias eucharis* (Drury). – Indian J. exp. Biol. *5,* 250–252.

Raven, Chr. P. (1961). Oogenesis: The storage of developmental information. – 274 pp. Oxford, London, New York, Paris: Pergamon Press.

Reich, E. & Goldberg, I. H. (1964). Actinomycin and nucleic acid function. In: Progress in nucleic acid research and molecular biology, vol. 3, p. 183–234 (J. N. Davidson and W. E. Cohn, ed.). – New York, London: Academic Press.

Revel, J. P. & Hay, E. D. (1963). An autoradiographic and electron microscopic study of collagen synthesis in differentiating cartilage. – Z. Zellforsch. *61,* 110–144.

Robinson, W. G. (1966). Microtubules in relation to the motility of a sperm syncytium in an armoured scale insect. – J. Cell Biol. *29,* 251–266.

Rohr, H. P. & Bremer, B. (1967). Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus des Parathohormones am Knochen. – Virchows Arch. Anat. *342,* 50–60.

Rohr, H. P., Glietmann, W. & Oehlert, W. (1965). Durchführung und Anwendungsmöglichkeiten der elektronenmikroskopischen Autoradiographie. – Z. ges. exp. Med. *139,* 344–356.

Rohr, H. P., Schmalbeck, J. & Feldhege, A. (1967). Elektronenmikroskopisch-autoradiographische Untersuchungen über die Eiweißsynthese in der Brunnerschen Drüse der Maus. – Z. Zellforsch. *80,* 183–204.

Rohr, H. P. & Sigwart, U. (1967). Elektronenmikroskopisch-autoradiographischer Beitrag zum Eiweißstoffwechsel der Leber. – Exp. Path. *1,* 234–242.

Rohr, H. P. & Walter, S. (1966). Die Mucopolysaccharidsynthese in ihrer Beziehung zur submikroskopischen Struktur der Knorpelzelle. – Acta Anat. *64,* 233.

Rosenbluth, J. & Wissig, S. L. (1963). The uptake of ferritin by toad spinal ganglion cells. – J. Cell Biol. *19,* 91A.

Roth, T. F. & Porter, K. R. (1962). Specialized sites on the cell surface for

protein uptake. – Fifth. Intern. Cong. Elec. Micr. LL-4. New York: Academic Press.

Roth, T. F. & Porter, K. R. (1963). Membrane differentiation for protein uptake. – Fed. Proc. *22*, No. 2, 178 abstract.

Roth, T. F. & Porter, K. R. (1964). Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* L. – J. Cell Biol. *20*, 313–332.

Ryser, H., Caulfield, J. B. & Aub, J. C. (1962). Studies on protein uptake by isolated tumor cells. I. Electron microscopic evidence of ferritin uptake by Ehrlich ascites tumor cells. – J. Cell Biol. *14*, 255–268.

Salpeter, M. M. & Bachmann, L. (1964). Autoradiography with the electron microscope. A procedure for improving resolution sensitivity and contrast. – J. Cell Biol. *22*, 469.

Schmalbeck, J. & Rohr, H. P. (1967). Die Mucopolysaccharid-Synthese in ihrer Beziehung zur Eiweißsynthese in der Brunnerschen Drüse der Maus. – Z. Zellforsch. *80*, 329–344.

Sirlin, J. L. (1963). The intracellular transfer of genetic information. – Intern. Rev. Cytol. *15*, 35–88.

Slautterback, D. B. (1967). Coated vesicles in absorptive cells of Hydra. – J. Cell Sci. *2*, 563–572.

Stay, B. (1965). Protein uptake in the oocytes of the cecropia moth. – J. Cell Biol. *26*, 49–62.

Sterba, G. & Schaeffner, H. (1965). Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der DNS in Lampenbürstenchromosomen mit NN'-Diäthylpseudoisocyaninchlorid. – Histochemie *5*, 260–278.

Stevens, B. J. & Swift, H. (1966). RNA transport from nucleus to cytoplasm in Chironomus salivary glands. – J. Cell Biol. *31*, 55–77.

Stockinger, L. (1964). Vitalfärbung und Vitalfluorchromierung tierischer Zellen. Protoplasmalogia II. D1. – 96 pp. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.

Straus, W. (1964). Cytochemical observations on the relationship between lysosomes and phagosomes in kidney and liver by combined staining for acid phosphatase and intravenously injected horseradish peroxidase. – J. Cell Biol. *20*, 497–507.

Telfer, W. H. (1965). The mechanism and control of yolk formation. – Ann. Rev. Ent. *10*, 161–184.

Thiery, J. P. (1967). Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. – J. Microscopie *6*, 987–1018.

Thiery, J. P. (1969). Rôle de l'appareil de Golgi dans la synthèse des mucopolysaccharides: Etudes cytochimique. 1. Mise en évidence de mucopolysaccharides dans les vésicules de transition entre l'ergastoplasme et l'appareil de Golgi. – J. Microscopie *8*, 689–708.

Thomas, K. K. & Gilbert, L. I. (1967). *In vitro* studies on the release and transport of phospholipids. – J. Insect Physiol. *13*, 963–980.

Thomas, K. K. & Lawrence, J. G. (1968). Isolation and characterization of the hemolymph lipoproteins of the American silkworm *Hyalophora cecropia*. – Arch. Biochem. Biophys. *127*, 512–521.

Tilney, L. G. & Porter, K. R. (1965). Studies on microtubules in Heliozoa. I. The fine structure of *Actinosphaerium nucleofilum* (Barrett) with particular reference to the axial rod structure. – Protoplasma *60*, 317–344.

Tilney, L. G. & Porter, K. R. (1967). Studies on the microtubules in Heliozoa. II. The effect of low temperature on these structures in the formation and maintenance of axopodia. – J. Cell Biol. *34*, 327–343.

Tobe, S. S. & Loughton, B. G. (1970). Haemolymphprotein metabolism during the fifth instar of Locusta. – Can. J. Zool. *48,* 297–304.

Wagner-Jevseenko, O. (1958). Fortpflanzung bei *Ornithodorus moubata* und genitale Übertragung von *Borrelia duttoni.* – Acta trop. *15,* 119–168.

Wang, C. M. & Patton, R. L. (1969). Lipids in the haemolymph of the cricket *Acheta domesticus.* – J. Insect. Physiol. *15,* 851–860.

Wartenberg, H. (1962). Elektronenmikroskopische und histochemische Studien über die Oogenese der Amphibieneizelle. – Z. Zellforsch. *58,* 427–486.

Wartenberg, H. (1964). Experimentelle Untersuchung über die Stoffaufnahme durch Pinocytose während der Vitellogenese des Amphibienoocyten. – Z. Zellforsch. *63,* 1004–1019.

Weber, H. (1966). Grundriß der Insektenkunde. – 428 pp. Stuttgart: Georg Fischer Verlag.

Wyss-Huber, M. & Luescher, M. (1967). Über die hormonale Beeinflußbarkeit der Proteinsynthese *in vitro* im Fettkörper von *Leucophaea maderae* (Insecta). – Rev. suisse Zool. *73,* 517–521.

Résumé

Les aspects dynamiques de la vitellogénèse de la tique *Ornithodorus moubata,* spécialement en ce qui concerne la synthèse du vitellus protéique et la formation de l'enveloppe de l'œuf, sont étudiés au niveau de l'ultrastructure à l'aide de trois marqueurs protéiques (la leucine tritiée comme précurseur, la ferritine et la peroxidase).

Il ressort des expériences qu'à la suite d'un repas sanguin et de la fécondation d'une tique femelle *Ornithodorus moubata* les performances endogènes de l'ovocyte sont plus importantes au début, c'est-à-dire que les protéines sont synthétisées par des structures de la cellule elle-même (stade A). Dans une phase suivante, l'oolemme forme des microvilli (Aeschlimann & Hecker, 1967 et 1969). L'ovocyte commence alors à résorber par pinocytose des protéines de l'hémolymphe, formées principalement au niveau de l'intestin moyen (stade B). Cette source exogène de protéines complète et dépasse même par la suite de la vitellogénèse la synthèse endogène des protéines de l'ovocyte.

Dans l'œuf mûr, le vitellus protéique est d'origine principalement endogène dans le centre de la cellule, tandis qu'il est surtout d'origine exogène dans les parties périphériques. L'enveloppe de l'œuf est formée par l'incorporation et la juxtaposition de protéines provenant de l'hémolymphe, dans la zone des microvilli.

La synthèse du glycogène commence très tôt, dès le début de la synthèse des protéines. Le glycogène est métabolisé pour former le vitellus complexe qui contient des hémo-glyco-lipo-protéines (Diehl, 1970), mais il est aussi mis en réserve pendant les phases avancées de la vitellogénèse sous forme de glycogène α qu'on trouve, ainsi que des lipides, inclus entre les grosses sphères vitellines.

Summary

Dynamic aspects of vitellogenesis in *Ornithodorus moubata,* particularly the synthesis of yolk proteins and the development of the eggshell, were studied using the electron microscope by means of three protein tracers (3H-Leucine as a protein precursor, Ferritin and Peroxidase). The results showed that following a blood meal and a copulation of the female *O. moubata* the endogenous activity of the oocytes predominates at the beginning of yolk deposition which means that the

proteins are synthesized by the cell structures themselves (state A). During the following phase, the oolemma forms microvilli (AESCHLIMANN & HECKER, 1967 and 1969). The oocyte now begins to take up, by pinocytosis, haemolymph proteins which are essentially preformed in the gut (state B). As vitellogenesis continues, this exogenous source of proteins completes and even exceeds the endogenous synthesis of proteins. In the mature egg the central yolk proteins are predominately built up from an endogenous source, while in the peripheral part, they originate from an exogenous source. The eggshell is formed by the incorporation and deposition of haemolymph proteins into the zone of microvilli.

The synthesis of glycogen begins very early, during the initial stages of protein synthesis. Part of this glycogen is metabolized to form the vitelline complex, which contains the haemo-lipo-glycoproteins (DIEHL, 1970). The other part of this glycogen is stored in the form of α-glycogen at a later phase of vitellogenesis. In the mature egg it is found together with lipis, between the big yolk spheres.

Curriculum vitae

Am 7. Juni 1941 wurde ich als Sohn des Schlossers Walter Jenni und der Marie, geb. Grabner, in Diegten/BL geboren. Am Geburtsort besuchte ich die Primarschule und in Sißach die Realschule. Anschließend absolvierte ich eine Berufslehre als Maschinenzeichner in der Firma Buß AG in Pratteln. Im Herbst 1964 bestand ich nach einer zweijährigen Vorbereitung am Institut Athenaeum in Basel die eidgenössische Maturitätsprüfung. Nachher wurde ich an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel immatrikuliert und nahm mein Studium in Zoologie als Hauptfach, Physik, Botanik, medizinischer Mikrobiologie, Mathematik und Geographie auf. Während des Studiums erwarb ich 1967 das Lehrpatent als Bezirkslehrer in Aarau.

Im Laufe meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Kurse folgender Herren Professoren und Dozenten: H. Annaheim, A. Aeschlimann, E. Baumgartner, F. Blumer, R. Conzelmann, E. Flückiger, T. Freyvogel, M. Geiger-Huber, R. Geigy, W. Habicht, P. Huber, H. Kappus, H. Kunz, H. Löffler, E. Miescher, H. Müller, H. Nüesch, A. Portmann, R. Schenkel, P. Scherrer, W. Stingelin und Z. Zoller.

Die vorliegende Dissertation entstand am Schweizerischen Tropeninstitut unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Geigy.

Allen meinen Lehrern möchte ich für die wertvollen und vielfältigen Anregungen während meiner Studienzeit herzlich danken.